



# Vers une surveillance des zoonoses associées aux rats (*Rattus norvegicus*)

Florence Ayral

## ► To cite this version:

Florence Ayral. Vers une surveillance des zoonoses associées aux rats (*Rattus norvegicus*). Médecine vétérinaire et santé animal. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. <NNT : 2015GREAS004>. <tel-01214325>

**HAL Id: tel-01214325**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01214325>**

Submitted on 12 Oct 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **MBS – Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Florence Ayrat**

Thèse dirigée par **Dominique Bicout** et  
Co dirigé par **Marc Artois**

préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG**  
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement**

## **Vers une surveillance des zoonoses associées aux rats (*Rattus norvegicus*)**

Thèse soutenue publiquement le **26 Mai 2015**,  
devant le jury composé de :

**Mme, Marie-Pierre, Ryser**

Dr, Université de Berne, Rapporteur

**M., Philippe, Vanhems**

Pr., Groupement Hospitalier Edouard Herriot à Lyon, Rapporteur

**M., Régis, De Gaudemaris**

Pr, Pôle Santé Publique CHU de Grenoble, Président

**Mme, Pascale, Bourhy**

Dr, CNR de la leptospirose Institut Pasteur, Examinatrice

**Mme, Zoheira, Djelouadji**

Dr, VetAgro Sup Lyon, Invitée

**M., Marc, Artois**

Pr., VetAgro Sup Lyon, co-directeur de thèse

**M., Dominique, Bicout**

Dr., EPSP/TIMC, Université Joseph Fourier, directeur de thèse











## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement les membres du jury :

Marc Artois qui a accepté ce sujet de thèse et qui m'a offert l'opportunité d'une reconversion à la santé publique vétérinaire. Je le remercie pour avoir contribué à ce travail, pour sa confiance, ses suggestions et son soutien en toute circonstance.

Dominique Bicout qui a accepté de diriger cette thèse et qui a trouvé une partie de son financement. Je le remercie pour avoir contribué à ce travail, pour sa disponibilité et sa capacité à rendre compréhensible la modélisation.

Marie-Pierre Ryser qui a aimablement accepté d'être rapporteur de mes travaux. Je la remercie pour ses remarques avisées.

Philippe Vanhems qui m'a reçue dans le Master EpiRis et qui a également accepté d'être rapporteur de mes travaux. Je le remercie pour sa bienveillance et ses remarques constructives.

Régis de Gaudemar qui a accepté d'être le président de mon jury de thèse.

Pascale Bourhy qui a accepté d'apporter son expertise sur mes travaux.

Zorée Djelouadji qui m'a accueillie dans l'Équipe des Leptospires et m'a apporté un constant soutien pour réaliser ces travaux. Je la remercie pour ces conseils avisés.

Je remercie les membres et les partenaires du projet WildTech :

Timothy Giles, Abu-Bakr Abu Median et Lisa Yon de l'Université de Nottingham – Royaume-Uni pour leur travail magistral de conception de la micro-puce « Rongeur commensaux » et pour leur gentillesse;

Mike Hutchings et son équipe de Scotland's Rural College pour leur intérêt dans mes travaux.

Frederik Widén du National Veterinary Institute – Uppsala, Suède pour avoir réalisé les analyses de détection du virus de l'hépatite E et pour notre collaboration;

Kieran Pounder et Lorraine McElhinney pour leurs investigations sur les hantavirus et pour notre collaboration;

Dominique Aubert et Isabelle Villena pour leurs analyses sur *Toxoplasma gondii* et leur conseils avisés;

Helena Pereira pour nos collaborations, son support technique inégalable, sa gentillesse et son amitié;

Françoise Oudeville et Fiona Van Moe pour leur soutien logistique et leur dévouement.

Je remercie les membres de l'USC 1233:

Etienne Benoît, pour son aide précieuse dans les petites comme dans les grandes tâches;

Philippe Berny pour ses contacts, sa contribution au matériel et son expertise murine;

Joffrey Goulois, Aurélien Merville et Florian Peigneaux pour leur contribution aux captures;

Angeli Kodjo qui m'a accueilli dans son laboratoire. Je le remercie pour son soutien et son intérêt en épidémiologie;

Michel Pépin qui m'a accueilli dans l'équipe PERS; Tatiana Dupinay, Anne-Laure Zilber et Maria-Halima Laaberki pour nos collaborations, leur aide et leur amitié.

Je remercie les membres du laboratoire IMAG/TIMC et en particulier M Cinquin, pour avoir accepté de me recevoir dans le cadre de ma thèse et Martine Meyer pour son soutien logistique toujours efficace.

Je remercie Solange Same et Kévin Julien Saint Amand pour les travaux effectués au cours de leur stage de Master qui ont servi aux objectifs de la thèse, pour leur motivation et pour leur sympathie.

Je remercie le personnel de la ville de Lyon qui a contribué avec enthousiasme au projet de capture: Gilbert Gault, Mickaël Da Rocha et Yves Durand du Service d'Hygiène de la ville de Lyon; David Gomis, Guillaume Douay, Alban Chauvet et les animaliers du Parc Zoologique de la Tête d'Or; Marc Lauffer et Patrick Brun de l'Agence d'urbanisme de Lyon; Joël Baud et le personnel de l'Usine d'Incinération des Ordures Ménagères-Gerland et, Sylvie Thauray du point contact Mermoz-Grand Lyon Habitat.

Je suis reconnaissante au projet Européen WildTech "Novel technologies for the surveillance of emerging and re-emerging infections of wildlife" – *the research leading to these results has recieved funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n°222633, namely the WildTech Project* – et également, à Vetagro Sup pour le financement de mon salaire et des travaux.

## TABLE DES MATIÈRES

PARTIE I: INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES ZOONOSES ASSOCIÉES AUX RATS ET LES PROBLÉMATIQUES D'ÉPIDÉMIOLOGIE SURVEILLANCE.....	15
CHAPITRE 1: LES ZOONOSES ASSOCIÉES AUX RATS (ZAR).....	17
1.1. Les zoonoses virales.....	18
1.2. Les zoonoses bactériennes.....	19
1.3. Les zoonoses parasitaires.....	21
1.4. Synthèse: ZAR présentes en France métropolitaine.....	22
CHAPITRE 2: NUISANCES ET DÉGÂTS OCCASIONNÉS À LA SANTÉ PAR LES RATS.....	25
2.1. Questions relatives à la persistance des agents pathogènes chez le rat surmulot.....	27
2.2. Questions relatives à l'exposition des hommes.....	30
2.3. Perturbations de l'environnement mondial et le risque d'émergence de ZAR.....	37
PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THÈSE .....	45
PARTIE II: ÉTUDES DE TERRAIN ET INVESTIGATIONS SUR LES ZOONOSES ASSOCIÉES AUX RATS CHEZ LA SOURCE - <i>RATTUS NORVEGICUS</i> -.....	53
CHAPITRE 3: MÉTHODES DE DÉTECTION DES AGENTS DE ZOONOSES ASSOCIÉES AUX RATS .....	55
3.1. Agents pathogènes ciblés.....	56
3.2. Mode d'échantillonnage de rats dans le Rhône (2011-2012).....	58
3.3. Virus de l'hépatite E par PCR.....	60
3.4. Hantavirus Séoul par séquençage massif.....	62
3.5. <i>L. interrogans</i> par séquençage.....	63
3.6. Multi-pathogènes par la micro-puce «Rongeurs commensaux».....	67
3.7. Identification d'agents zoonotiques, et comparaison des méthodes sur des échantillons de rats sauvages.....	69
CHAPITRE 4: DISTRIBUTION SPATIALE DU RISQUE DE ZOONOSES ASSOCIÉES AUX RATS ET INDICATEURS .....	77

CHAPITRE 5: FOCUS SUR <i>LEPTOSPIRA INTERROGANS</i> .....	93
5.1.    Distribution de <i>L.interrogans</i> circulant par « multispacer sequence typing ».....	94
5.1.    Dynamique de persistance de <i>L. interrogans</i> parmi les rats.....	120
 PARTIE III: INVESTIGATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES DE LA LEPTOSPIROSE CHEZ DES CIBLES (ANIMAUX DOMESTIQUES).....	131
PRÉAMBULE SUR LA RELATION LEPTOSPIROSES HUMAINES – LEPTOSPIROSES DES ANIMAUX DOMESTIQUES.....	133
 CHAPITRE 6: DISTRIBUTION DE <i>LEPTOSPIRA</i> CIRCULANT CHEZ LES CHIENS ET LES BOVINS.....	137
 CHAPITRE 7: DISTRIBUTION SPATIO-TEMPORELLE DE L’INCIDENCE DE LA LEPTOSPIROSE CANINE EN FRANCE.....	143
7.1.    Introduction.....	144
7.2.    Matériel et Méthode.....	144
7.3.    Résultats.....	148
7.4.    Discussion.....	152
 CHAPITRE 8: DISTRIBUTION SPATIALE DU RISQUE LEPTOSPIROSIQUE CHEZ DES ANIMAUX DOMESTIQUES, (BOVIN, CHIEN ET PORC) APPROCHE BAYÉSIENNE.....	157
 DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION GÉNÉRALE.....	183
RÉFÉRENCES .....	199
ANNEXES.....	211

## Liste des acronymes et sigles

ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
ARN	Acide Ribo Nucléique
CAN	Canicola
CNR	Centre National de Référence
ECDC	European Centre for Diseases control
EFSA	European Food and Safety Authority
ELIZ	Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses
ESA	Epidémiosurveillance des maladies animales
FHSR	Fièvre hémorragique avec syndrome rénal
IAHP	Influenza Aviaire Hautement Pathogène
IH	Icterohaemorrhagiae
INVS	Institut National de Veille Sanitaire
MAT	Micro Agglutination Test
MST	Multispacer Sequence Typing
NR	Non rapporté
OIE	Organisation Mondiale de la Santé Animale
EOPS	Exempt d'Organisme Pathogène Spécifié
PCR	Polymerase Chain Reaction
PUUV	Puumala Virus
SRAS	Syndrome Respiratoire Aiguë Sévère
SCP	Syndrome Cardio-Pulmonaire
SEOV	Hantavirus Séoul
SL	Sensu Largo
SPF	Specific-Pathogen-Free
VHE	Virus de l'hépatite E
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
ZAR	Zoonoses associées aux rats

## Table des figures

Figure 1 – <i>Rattus norvegicus</i> .....	12
Figure 2 – Organigramme des chapitres du mémoire .....	13
Figure 3 – Distribution spatiale de la prévalence des rats infectés.....	27
Figure 4 – Population à risque.....	32
Figure 5 – Influence du changement climatique .....	39
Figure 6 – Trajectoire des cargos en 2007.....	41
Figure 7 – Synthèse des problématiques relatives aux ZAR.....	43
Figure 8 – Distribution des sites de captures dans le Rhône.....	59
Figure 9 – Dynamique d’infection de <i>L.interrogans</i> chez le rat surmulot .....	65
Figure 10 – Dynamique d’une population type en milieu urbain.....	126
Figure 11 – Dynamique d’une population type en milieu rural.....	127
Figure 12 – Mécanisme de persistance de la leptospirose au sein de populations de rats .....	129
Figure 13 – Algorithme de discrimination des cas de leptospirose canine.....	150
Figure 14 – Distribution de l’indicateur de l’incidence départementale.....	153
Figure 15 – Distribution de l’indicateur de l’incidence mensuelle.....	154
Figure 16 – Distribution spatiale de l’indicateur d’incidence de leptospirose canine.....	155
Figure 17 – Cycle de transmission et d’infection leptospirosique.....	216
Figure 18 – Cycle de transmission.....	218
Figure 29 – Cycle de transmission de <i>R. typhi</i> .....	220
Figure 20 – Cycle de transmission de <i>T. gondii</i> .....	236
Figure 21 – Sites de capture des rats surmulots à Lyon.....	301
Figure 22 – Outils de capture des rats.....	302
Figure 23 – Étapes de traitement des rats surmulots capturés.....	303
Figure 24 – The spatial distribution leptospiral carriage among 130 Norway rats in Liverpool .....	315
Figure 25 – Distribution des sérogroupes.....	316

## Table des tableaux

Tableau 1 – Zoonoses virales décrites chez le rat surmulot.....	18
Tableau 2 – Zoonoses bactériennes décrites chez le rat surmulot ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	19
Tableau 3 – Zoonoses parasitaires décrites chez le rat surmulot.....	21
Tableau 4 – Zoonoses potentiellement transmises du rat à l’Homme.....	22
Tableau 5 – Indicateurs de l’impact sanitaire de la leptospirose en France.....	33
Tableau 6 – Agents dont la présence a été recherchée.....	57
Tableau 7 – Méthodes conventionnelles.....	58
Tableau 8 – Détection des agents par les méthodes conventionnelles.....	69
Tableau 9 – Agents détectés par la micro-puce "Rongeurs commensaux".....	70
Tableau 10 – Distribution des résultats positifs pour <i>L. interrogans</i> .....	71
Tableau 11 – Discordance entre les tests.....	72
Tableau 12 – Concordance des résultats obtenus par la micro-puce et la PCR.....	72
Tableau 13 – Hantavirus Séoul par la micro-puce et la PCR.....	73
Tableau 14 – Valeurs des paramètres inclus dans le modèle de dynamique des populations.....	132
Tableau 15 – Valeurs des paramètres du modèle.....	138
Tableau 16 – Synthèse sur les outils et méthodes de surveillance.....	198
Tableau 17 – Coordonnées géographiques des sites de capture.....	299
Tableau 18 – Caractéristiques des sites de capture ruraux.....	300
Tableau 19 – Distribution of four potential zoonotic agents.....	304
Tableau 20 – Distribution of rat covariates.....	305
Tableau 21 – Distribution of socio-economic variables.....	306
Tableau 22 – Distribution of variables “human population” and “median incomes”.....	307
Tableau 23 – Capture success and infected rats in 5 trapping sites.....	308
Tableau 24 – Coefficients.....	309
Tableau 25 – Paramètres définissant les populations urbaines et rurales.....	310
Tableau 26 – Liste des souches de <i>Leptospira</i> spp.....	312





## INTRODUCTION

Plus de 1400 maladies microbiennes sont décrites chez l'homme dont 60% sont d'origine zoonotique (*i.e.* naturellement transmissibles entre l'animal et l'Homme) (Taylor *et al.*, 2001). Au milieu du XX<sup>e</sup> siècle l'utilisation des antibiotiques et des vaccins a laissé entrevoir une future éradication des maladies infectieuses<sup>1</sup>. Les phénomènes d'adaptabilité des micro-organismes à leur environnement (transduction, mutation, recombinaison) et de résistance n'avaient alors pas été pris en compte. Aujourd'hui, les maladies infectieuses sont responsables de plus de 15 millions de morts par an dans le monde (Morens *et al.*, 2004). Parmi elles, le développement d'agents résistants aux antibiotiques pose un problème majeur de santé publique. *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* sont des exemples de bactéries dont certaines souches sont multi-résistantes, limitant le traitement des personnes infectées. La résistance aux antibiotiques est un des phénomènes responsables d'émergence parmi d'autres comme le changement climatique et la mondialisation. Un des facteurs qui semble prépondérant pour expliquer l'émergence de maladies infectieuses nouvelles chez l'homme, est l'exposition à des micro-organismes portés par des animaux sauvages (Jones *et al.*, 2008). Dans ce contexte de persistance des maladies infectieuses et d'émergence d'agents zoonotiques, l'épidémiologie et la maîtrise des maladies infectieuses restent des garants de la santé humaine et animale.

Dans notre travail, nous avons délibérément choisi d'avoir une approche écosystémique des questions de santé: l'homme fait partie d'un écosystème, incluant son environnement physique et chimique (biotope) et l'ensemble des espèces qui y vivent (biocénose). Tous les éléments qui composent l'écosystème humain sont interconnectés et en constant réajustement pour répondre à la variabilité des uns et des autres. Le concept « une seule santé » ne se limite pas à la seule considération de la santé de l'Homme, il souligne la nécessité d'inclure la santé de l'environnement et des populations animales (Karesh et Cook, 2005). Ainsi santé publique et santé animale sont liées dans le concept de santé publique vétérinaire (<http://www.ensv.fr/node/38>) au sein de laquelle, la santé de la faune sauvage est une source possible d'agents zoonotiques et mérite une attention particulière (Bengis *et al.*, 2004).

---

<sup>1</sup> <http://www.who.int/bulletin/volumes/86/8/08-056242/en/> consulté le 31/03/2015

Parmi les espèces de la faune sauvage nous avons choisi de nous intéresser au rat surmulot ou rat brun (*Rattus norvegicus*) (Figure 1), qui est source de nombreuses maladies humaines. Les rats sont particulièrement problématiques en santé publique car leur mode de vie synanthrope (*cf.* chapitre 2) favoriserait la transmission de maladies. L'environnement urbain est un habitat optimal (abri, nourriture et eau *ad libitum*) pour les rats qui, de fait, l'ont colonisé. Les rats représentent une menace pour la santé publique d'autant plus marquée que se développe une urbanisation massive et anarchique. Bien que certaines de ces maladies soient multi-hôtes, la relative indépendance des colonies de rats en milieu urbain permettrait de considérer cette espèce comme une entité pour étudier ses agents zoonotiques. De nombreuses études ont décrit les maladies transmises par les rats (Himsworth *et al.*, 2013a; Meerburg *et al.*, 2009), cependant l'épidémiologie de ces maladies et leurs effets sur les rats sont complexes. Des lacunes dans les connaissances limitent les actions de surveillance et d'estimation du risque sanitaire associé aux rats et par conséquent, limitent le développement de stratégies appropriées pour maîtriser et prévenir les zoonoses associées aux rats que nous désignerons par la suite par l'acronyme: ZAR.

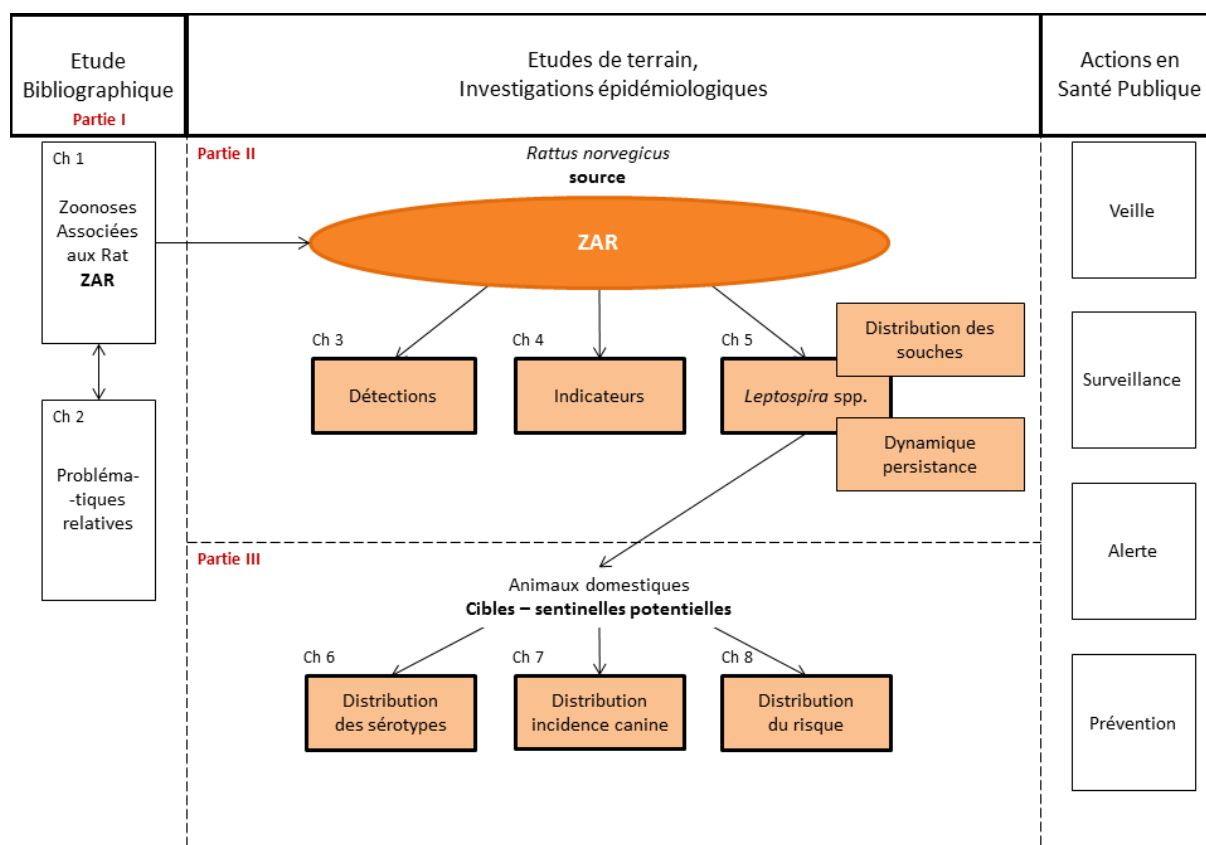


**Figure 1 - *Rattus norvegicus***

[http://www.biopix.eu/surmulot-rattus-norvegicus\\_photo-41161.aspx](http://www.biopix.eu/surmulot-rattus-norvegicus_photo-41161.aspx)

consulté le 02/12/2014

L'objectif général de notre travail est de proposer un schéma de surveillance des ZAR. Pour y parvenir, nous avons conduit des études et travaux personnels dans le double cadre d'une thèse de 3<sup>ème</sup> cycle et d'une résidence du Collège Européen de Santé Publique Vétérinaire. Nos travaux: études bibliographiques, enquêtes de terrain, diagnostics de laboratoire, traitement de données peuvent se regrouper selon la logique que nous indiquons sur la figure 2, où sont présentés les chapitres de ce manuscrit. Notre démarche vise à identifier les éléments importants pour établir une surveillance des ZAR et situe cette démarche dans le contexte des actions de santé publique vétérinaire. Une première partie bibliographique fait l'état des lieux des ZAR (chapitre 1) et des problématiques relatives (chapitre 2). Les études de terrain regroupent une partie sur les investigations épidémiologiques chez le rat surmulot dans le Rhône (chapitres 3 à 5) et une partie sur l'épidémiologie de la leptospirose chez les animaux domestiques en France (chapitres 6 à 8). Une discussion des études de terrain est ensuite développée en regard des alternatives de surveillance disponibles.



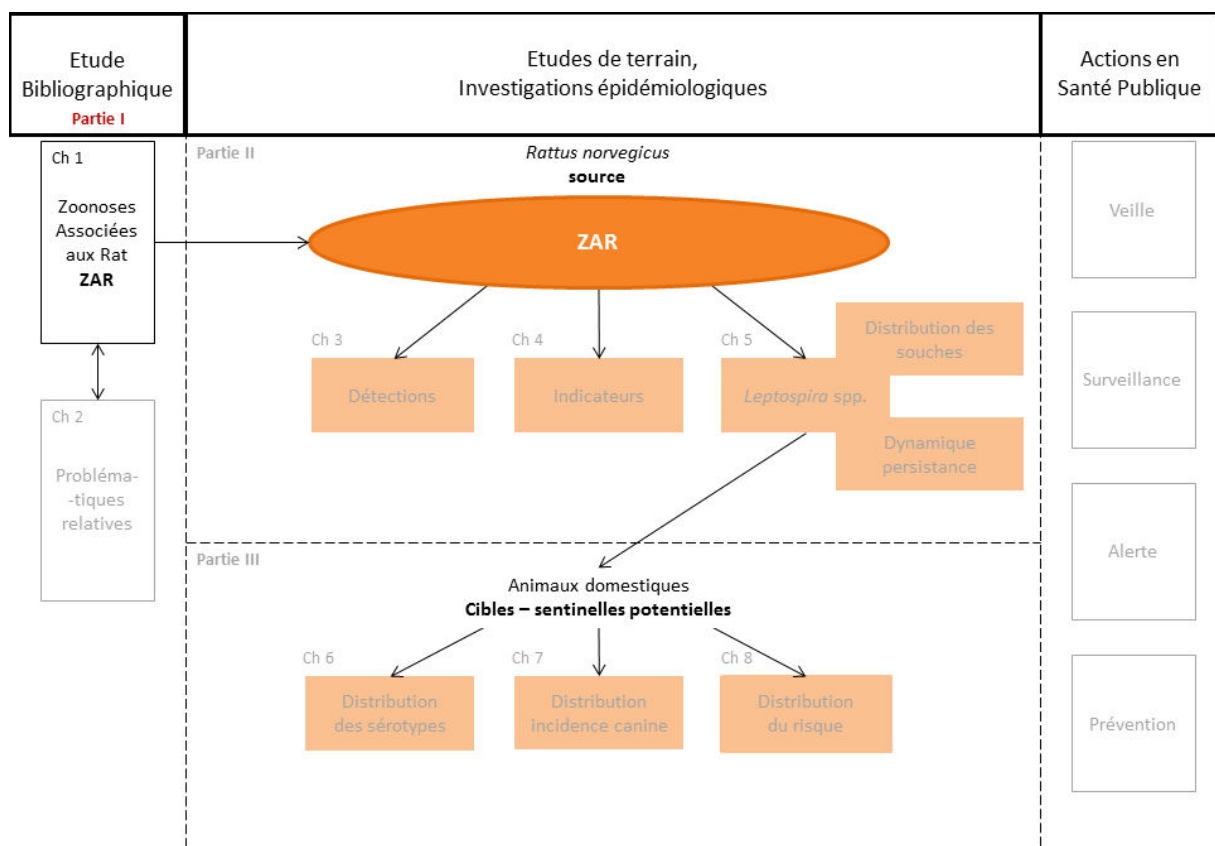
**Figure 2 – Organigramme des chapitres du mémoire**



PARTIE **I**: INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

SUR LES ZOONOSES ASSOCIÉES AUX RATS (ZAR)

ET LES PROBLÉMATIQUES D'ÉPIDÉMIOLOGIE



# CHAPITRE 1:

## LES ZOONOSES ASSOCIÉES AUX RATS

Nous appelons ZAR, les zoonoses associées au rat. Avant de présenter les arguments en faveur d'une surveillance épidémiologique de ces zoonoses portées par les rats, nous avons réalisé une revue de littérature sur ces maladies. Toutefois, pour ne pas alourdir le texte de ce mémoire par des synthèses qui sont en grande partie déjà disponibles dans plusieurs sources, nous avons synthétisé les données essentielles dans des tableaux synoptiques. Il est ainsi possible d'avoir une vue d'ensemble des maladies concernées (en terme de présence et de gravité) tout en ayant accès aux informations détaillées en Annexe 1. Dans le cadre de notre problématique générale (*cf.* p.48), nous visons à mieux comprendre comment les agents zoonotiques persistent dans les populations murines et sont ensuite transmis aux humains. Nous avons ensuite l'ambition d'utiliser ces connaissances pour définir un système de surveillance épidémiologique de ces zoonoses, soit au niveau des populations sources, soit au niveau des populations d'animaux domestiques. Nous avons donc centré nos lectures sur les questions d'interactions entre des agents pathogènes, leur hôte réservoir ou relais, et l'environnement. Les enjeux de santé publique ont été envisagés ensuite. La présentation de ces tableaux se fera en quatre parties:

- 1.1 Les zoonoses virales
- 1.2 Les zoonoses bactériennes
- 1.3 Les zoonoses parasitaires
- 1.4 Synthèse: ZAR présentes en France



## 1.1. Les zoonoses virales

**Tableau 1 – Zoonoses virales décrites chez le rat surmulot**

Maladie chez l'Homme	Agent	Manifestations chez le rat	Porteur / réservoir	Manifestations chez l'Homme	Mode de transmission chez le rat	Mode de transmission à l'Homme	Distribution géographique (principalement)	Pop. à risque	risque d'inf.	Santé Hum.	Impact écon.	Références
Fièvre Hémorragique avec Syndrome Rénal	Hantavirus Séoul	NR	réservoir	Fièvre, hémorragie, insuffisance rénale	urine, fèces, salive contaminées	urine, fèces, salive contaminées	mondiale (Asie)	2	2	2	2	(Ayrat, 2013a; Heyman <i>et al.</i> , 2004, 2009; Jameson <i>et al.</i> , 2013a; Jiang <i>et al.</i> , 2008)
Hépatite E	Virus de l'hépatite E	NR	?	hépatite aiguë	NR	nourriture contaminée	mondiale (Asie)	3	2	1	2	(Favorov <i>et al.</i> , 2000; Johne <i>et al.</i> , 2010; Lack <i>et al.</i> , 2012; Purcell <i>et al.</i> , 2011)
Poxvirose	Virus Cowpox	NR	réservoir	ulcère cutané	contact étroit	contact étroit	Eurasie	1	1	1	1	(Chantrey <i>et al.</i> , 1999; Ducournau <i>et al.</i> , 2013; Kurth <i>et al.</i> , 2008; Ninove <i>et al.</i> , 2009; Vogel <i>et al.</i> , 2012)

"Réservoir" selon la définition de Haydon *et al.*, 2002 / "portage" lorsque la transmission à l'Homme ou à d'autres espèces animales n'a pas été rapportée

Population humaine à risque: niveau local = 1, régional = 2, > 2 continents = 3

Risque d'infection pour l'Homme: probabilité de développer la maladie (toute voie confondue et pas uniquement par les rats): faible = 1, modéré = 2, fort = 3

Santé humaine: mortalité sans traitement <5% = 1, 5 à 10% = 2, >10% = 3.

Impact économique: pertes associées à la morbidité et d'autres causes (*e.g.* perte de production): faible = 1, modéré = 2, fort = 3.

NR: non rapporté(es) ou non décrit(es)

## 1.2. Les zoonoses bactériennes

**Tableau 2 – Zoonoses bactériennes décrites chez le rat surmulot**

Maladie(s) chez l'Homme	Agent(s)	Manifestations chez le rat	Porteur / réservoir	Manifestations chez l'Homme	Mode de transmission chez le rat	Mode de transmission à l'Homme	Distribution géographique (principalement)	Pop. à risque	risque d'inf.	Santé Hum.	Impact écon.	Références
Leptospirose Maladie de Weil	<i>Leptospira interrogans</i> + 9 autres espèces	NR	réservoir	fièvre, ictère, insuffisance rénale, et / ou hémorragies pulmonaires	Urine contaminée	Urine contaminée	mondiale (régions tropicales et subtropicales)	3	2	3	2	(Adler et de la Peña Moctezuma, 2010; Bharti <i>et al.</i> , 2003; Evangelista et Coburn, 2010; Guerra, 2009; Jansen <i>et al.</i> , 2005; Ko <i>et al.</i> , 2009)
Peste bubonique	<i>Yersinia pestis</i>	Sepsis fatal	réservoir	fièvre, lymphadénite +/-sepsis fatal	<i>Xenopsylla cheopsis</i> (puces)	<i>X. cheopsis</i>	Mondiale (Asie, Afrique, Amérique du sud)	2	2	2	2	(Boisier <i>et al.</i> , 2002; Chanteau <i>et al.</i> , 1998; Perry et Fetherston, 1997)
Typhus murin	<i>Rickettsia typhi</i>	NR	réservoir	fièvre, éruption cutanée, autolimitante	<i>X. cheopsis</i>	<i>X. cheopsis</i>	mondiale (Europe du sud, Asie du sud-est)	2	1	1	1	(Balleydier <i>et al.</i> , 2015; Civen et Ngo, 2008; Walter <i>et al.</i> , 2012)
Bartonellose	<i>Bartonella elizabethae</i> + 4 autres	NR	réservoir	fièvre, endocardite, neurorétinite	<i>X. cheopsis</i>	<i>X. cheopsis</i>	mondiale	2	2	1	1	(Billeter <i>et al.</i> , 2011; Boulouis <i>et al.</i> , 2005; Breitschwerdt et Kordick, 2000; Saisongkorh <i>et al.</i> , 2009)
Fièvre de Haverhill/ Streptobacillose ou Sodoku	<i>Streptobacillus moniliformis</i> ou <i>Spirillum minus</i>	NR	réservoir (bactéries commensales)	fièvre, éruptions, polyarthrite, pharyngite	contact étroit	contact étroit, morsure, nourriture contaminée	mondiale	2	1	3	1	(Elliott, 2007; Gaastra <i>et al.</i> , 2009)

Infection résistante aux antibiotiques	<i>Staph. aureus</i> méticillino-résistant	NR	portage	infection cutanée et des tissus mous	NR	NR	mondiale	3	2	2	3	(Cimolai, 2010; Himsworth <i>et al.</i> , 2014a; Stefani <i>et al.</i> , 2012; Zetola <i>et al.</i> , 2005)
Infection résistante aux antibiotiques	<i>Staph. pseudintermedius</i> méticillino-résistant	NR	portage	infection cutanée	NR	NR	mondiale	3	2	2	2	(van Duijkeren <i>et al.</i> , 2011; Himsworth <i>et al.</i> , 2013b; Laarhoven <i>et al.</i> , 2011)
Tuberculose	<i>Mycobacterium bovis</i>	Abcès	portage	pneumonie	NR	NR	mondiale	3	2	3	3	(Delahay <i>et al.</i> , 2002)
Colibacillose	<i>E. coli</i> (O157 STEC)	NR	portage	gastro-entérite	féco-orale	nourriture contaminée	mondiale	3	1	3	2	(Chen et Frankel, 2005; Nielsen <i>et al.</i> , 2004)
Salmonellose	<i>Salmonella</i> spp.	NR	réservoir	gastro-entérite	féco-orale	Sols/eau contaminés	mondiale	3	1	1	3	(Coburn <i>et al.</i> , 2007; Levantesi <i>et al.</i> , 2012; Nkogwe <i>et al.</i> , 2011; Yokoyama <i>et al.</i> , 2007)
Campylobacteriose	<i>Campylobacter</i> spp.	NR	portage	gastro-entérite	féco-orale	Sols/eau contaminés	mondiale	3	1	1	3	(Firth <i>et al.</i> , 2014; Nkogwe <i>et al.</i> , 2011; Silva <i>et al.</i> , 2011)
Yersiniose	<i>Yersinia enterocolitica</i>	NR	portage	gastro-entérite	féco-orale	Sols/eau contaminés	mondiale	3	2	1	1	(Backhans <i>et al.</i> , 2011; Laukkanen <i>et al.</i> , 2008; Williams et Barker, 2001)
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	NR	portage	gastro-entérite	féco-orale	Sols/eau contaminés	mondiale	3	?	1	1	
Infection à <i>Clostridium</i>	<i>Clostridium difficile</i>	NR	portage	colite	NR	Sols/eau contaminés	mondiale	3	2	2	3	(Clements <i>et al.</i> , 2010; Himsworth <i>et al.</i> , 2014b)

"Réservoir" selon la définition de Haydon *et al.*, 2002 / "portage" lorsque la transmission à l'Homme ou à d'autres espèces animales n'a pas été rapportée

Population humaine à risque: niveau local = 1, régional = 2, > 2 continents = 3

Risque d'infection pour l'Homme: probabilité de développer la maladie (toute voie confondue et pas uniquement par les rats): faible = 1, modéré = 2, fort = 3

Santé humaine: mortalité sans traitement <5% = 1, 5 à 10% = 2, >10% = 3.

Impact économique: pertes associées à la morbidité et d'autres causes (*e.g.* perte de production): faible = 1, modéré = 2, fort = 3.

NR: non rapporté(es) ou non décrit(es)

### 1.3. Les zoonoses parasitaires

**Tableau 3 – Zoonoses parasitaires décrites chez le rat surmulot**

Maladie Chez l'Homme	Agent	Maladie associée au rat	Porteur / réservoir	Maladie associée à l'Homme	Mode de transmission chez le rat	Mode de transmission chez l'Homme	Distribution géographique	Pop. à risque	risque d'inf.	Santé Hum.	Impact écon.	Références
Cryptosporidiose	<i>Cryptosporidium</i> spp.	NR	réservoir	entérite	féco-orale	nourriture/eau contaminée	mondiale	3	2	2	1	(Kimura <i>et al.</i> , 2007)
Toxoplasmose	<i>Toxoplasma</i> <i>gondii</i>	NR	réservoir	fièvre, lymphadénopathie, Toxoplasmose congénitale	nourriture ou environnement contaminé	nourriture ou environnement contaminé	mondiale	3	2	2	3	(Dubey <i>et al.</i> , 2006; Gottelet <i>et al.</i> , 2014; Mosallanejad <i>et al.</i> , 2012; Webster, 1994; Webster et Macdonald, 1995; Yin <i>et al.</i> , 2010)
Trichinellose	<i>Trichinella spiralis</i> , nématode	NR	réservoir	gastro-entérite	environnement contaminé	viete de porc contaminée crue ou mal cuite	mondiale	3	2	1	2	(Pozio <i>et al.</i> , 2009; Thi <i>et al.</i> , 2014)
Angiostrongilose	<i>Angiostrongilus</i> <i>cantonensis</i> , nématode	pneumonie granulo- mateuse	réservoir	fièvre, angiostrongilose oculaire ou mningée	consommation de l'hôte paraténique (mollusque)	consommation de l'hôte paraténique (mollusque)	Asie, Australie, Caraïbes, Pacifique sud	2	1	3	1	(Wang <i>et al.</i> , 2008, 2012)
Hymenolepiase	<i>Hymenolepis</i> spp, cestode <i>Rodentolepis</i> spp, cestode	NR	réservoir	asymptomatique	féco-orale	nourriture ou environnement contaminé	Australie	1	1	1	1	(Hancke <i>et al.</i> , 2011; Milazzo <i>et al.</i> , 2010)
Capillariose hépatique	<i>Capillaria hepatica</i>	NR	réservoir	hépatite éosinophilique (+/- subclinique)	féco-orale	nourriture ou environnement contaminé	mondiale	3	1	1	1	(Easterbrook <i>et al.</i> , 2007; Kataranovski <i>et al.</i> , 2011; R Ceruti, 2001)

"Réservoir" selon la définition de Haydon *et al.*, 2002 / "portage" lorsque la transmission à l'Homme ou à d'autres espèces animales n'a pas été rapportée

Population humaine à risque: niveau local = 1, régional = 2, > 2 continents = 3

Risque d'infection pour l'Homme: probabilité de développer la maladie (toute voie confondue et pas uniquement par les rats): faible = 1, modéré = 2, fort = 3

Santé humaine: mortalité sans traitement <5% = 1, 5 à 10% = 2, >10% = 3.

Impact économique: pertes associées à la morbidité et d'autres causes (*e.g.* perte de production): faible = 1, modéré = 2, fort = 3.

NR: non rapporté(es) ou non décrit(es)

#### 1.4. Synthèse: ZAR présentes en France métropolitaine

**Tableau 4 – Zoonoses potentiellement transmises du rat à l'Homme et rapportées en France métropolitaine**

Agent zoonotique	Manifestations chez le rat	Manifestations chez l'Homme	Voie de transmission chez le rat	Voie de transmission chez l'Homme	cas humains rapportés	Références
Virus cowpox	NR	nodule ulcératif	directe	directe	20 cas (2009)	(Ninove <i>et al.</i> , 2009)
Hantavirus spp	NR	FHRS	directe ou indirecte	directe ou indirecte	2 cas <sup>a</sup> 3 cas <sup>b</sup>	(Macé <i>et al.</i> , 2013; Zeller <i>et al.</i> , 2005) (Vogt, 2010)
<i>Leptospira</i> spp.	NR	syndrome hépatorénal et d'hémorragie pulmonaire	directe ou indirecte via l'urine	directe ou indirecte via l'urine	≈300 cas/an <sup>c</sup>	(Dupouey <i>et al.</i> , 2014)
<i>Toxoplasma gondii</i>	NR	fièvre, toxoplasmose congénitale	indirecte (directe probable)	Indirecte via hôtes intermédiaires ou définitifs	199 cas <sup>c</sup> (2011)	CNR Toxoplasmose <sup>2</sup>

<sup>a</sup>1 cas suspecté en 2001 et 1 cas confirmé en 2012 d'hantavirose à virus Séoul

<sup>b</sup>3 cas de séroconversion chez le personnel d'un laboratoire où un rat-sentinel avait des anticorps dirigés contre Hantaan

<sup>c</sup>part des cas attribuables aux rats non connue

NR: non rapporté(es)

FHRS: Fièvre Hémorragique avec Syndrome Rénal

Les infections humaines par *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. et *Yersinia* spp. sont largement rapportées en France avec plus de 8000 cas, 5000 cas et 430 cas respectivement en 2013 (EFSA, ECDC, 2015). Ce sont des zoonoses d'origine alimentaire majeures en ce qui concerne l'incidence cependant la part attribuable au rat n'est pas connue.

<sup>2</sup> <http://cnrttoxoplasmose.chu-reims.fr/wp-content/uploads/2013/01/DIAG2011-indicateurs-remarquables.pdf>  
consulté le 03/03/2015

### **Résumé du chapitre 1**

Les rats sont les sources d'agents zoonotiques responsables de morbidité et de mortalité chez l'Homme, mais la majorité des agents décrits dans les manuels n'est pas notifiée en France, il est donc possible que la connaissance résultant de la science « académique » sous-estime la situation épidémiologique en France. Comme nous le signalons plus loin, il est en outre possible que parmi les agents de zoonoses déjà rapportés en France, le risque soit sous-estimé et que des cas humains puissent apparaître de façon fortuite (hantavirose à virus Séoul) ou à la faveur d'incidents (inondations, grèves des éboueurs).

Le rat peut être à la fois hôte réservoir exclusif de certains agents pathogènes (*e.g. Streptobacillus moniliformis*, Hantavirus Séoul, *Angiostrongilus cantonensis*), hôte réservoir principal pour d'autres (*e.g. Leptospira* spp., *Yersinia pestis*, virus cowpox, *Rickettsia typhi*) et hôte de microbes communément associés à d'autres espèces hôte (*Bartonella* spp, SARM, SPRM, *Salmonella* spp, *C.difficile*, *T.gondii*, *Cryptosporidium* et *Trichinella* spp.). Ces données de la littérature documentent la priorisation des agents pathogènes issus du rat et d'intérêt en santé publique. En France, la ZAR d'importance majeure en termes d'incidence et de gravité est la leptospirose. Dans ce contexte, les travaux de thèse ont visé en particulier, à documenter cette maladie.



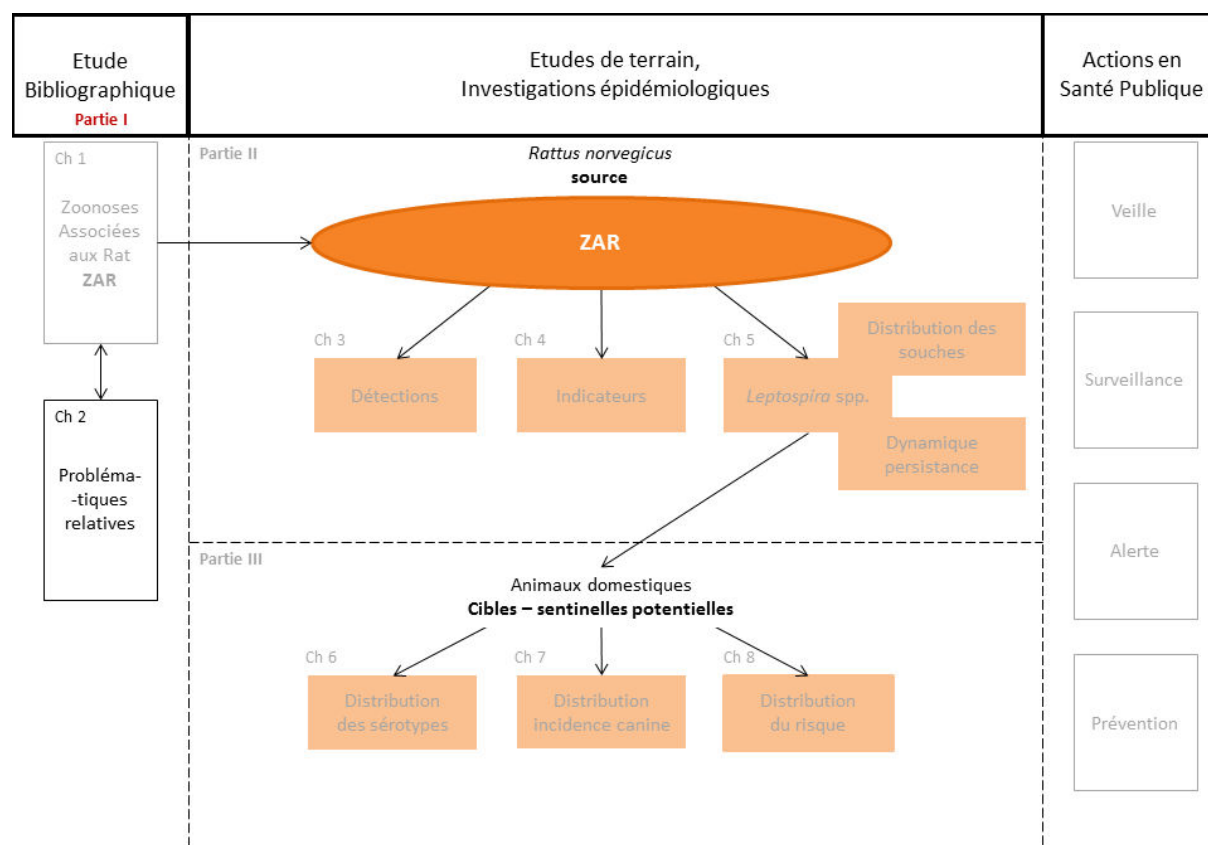
# CHAPITRE 2:

## NUISANCES ET DÉGÂTS

### OCCASIONNÉS À LA SANTÉ PAR LES RATS

Une synthèse des questions à répondre en santé publique relatives aux ZAR est présentée ici, afin de dresser l'état des lieux des connaissances disponibles et de celles restant à découvrir pour établir une surveillance appropriée de ces maladies. Au préalable, un bref rappel sur l'étho-écologie du rat surmulot (*cf.* encadré) décrit sa place dans le règne animal et dans nos sociétés en particulier. Ce chapitre est organisé en trois parties:

- 2.1 Les questions relatives à la persistance des agents pathogènes chez le rat surmulot
- 2.2 Les questions relatives à l'exposition des hommes
- 2.3 Les facteurs de risque environnementaux d'émergence et de réémergence de ZAR





## Rappel sur l'éco-éthologie de l'hôte – le rat surmulot

### Les rongeurs

Chez les mammifères, l'ordre des rongeurs (*Rodentia*) est le plus large avec plus de 2000 espèces et représente 44% de l'ensemble des mammifères. D'un point de vue géographique, les rongeurs sont également prédominants, ils ont colonisé tous les continents à l'exception de l'antarctique. Ils doivent cette prépondérance à leur capacité d'adaptation aux différents écosystèmes urbains, ruraux ou sylvatiques (Pocock *et al.*, 2004). La synanthropie est une forme de commensalisme qui caractérise certains rongeurs. Elle qualifie le mode de vie particulier d'animaux non domestiques tirant profit de leur proximité de l'Homme et de son habitat. Les rongeurs dits synanthropes vivent dans l'habitat humain, ils se nourrissent des aliments et des déchets produits par ce dernier et utilisent les constructions pour s'abriter.

### Dispersion des rongeurs synanthropes

En Europe, les rongeurs commensaux de l'Homme sont le rat surmulot (*Rattus norvegicus*), le rat noir (*Rattus rattus*) et les souris domestiques (*Mus musculus* et *M. spretus*) (Masi, 2010; Louarn et Quéré, 2003). En Europe de l'ouest et en particulier dans les milieux urbains en France, le rat surmulot et la souris domestique sont prédominants. L'ubiquité du rat est principalement attribuable à son habilité à s'adapter efficacement et rapidement à un nouvel environnement et à de nouvelles ressources (Feng, 2013). Le rat surmulot est particulièrement adapté à l'habitat de l'Homme et peu de populations «sylvatiques» sont décrites en dehors de sa zone d'origine et de milieux insulaires colonisés, il est donc presque exclusivement synanthrope. Sa capacité à envahir et endommager les infrastructures de l'Homme et, à consommer et dégrader ses ressources alimentaires font du rat, un nuisible depuis des siècles.

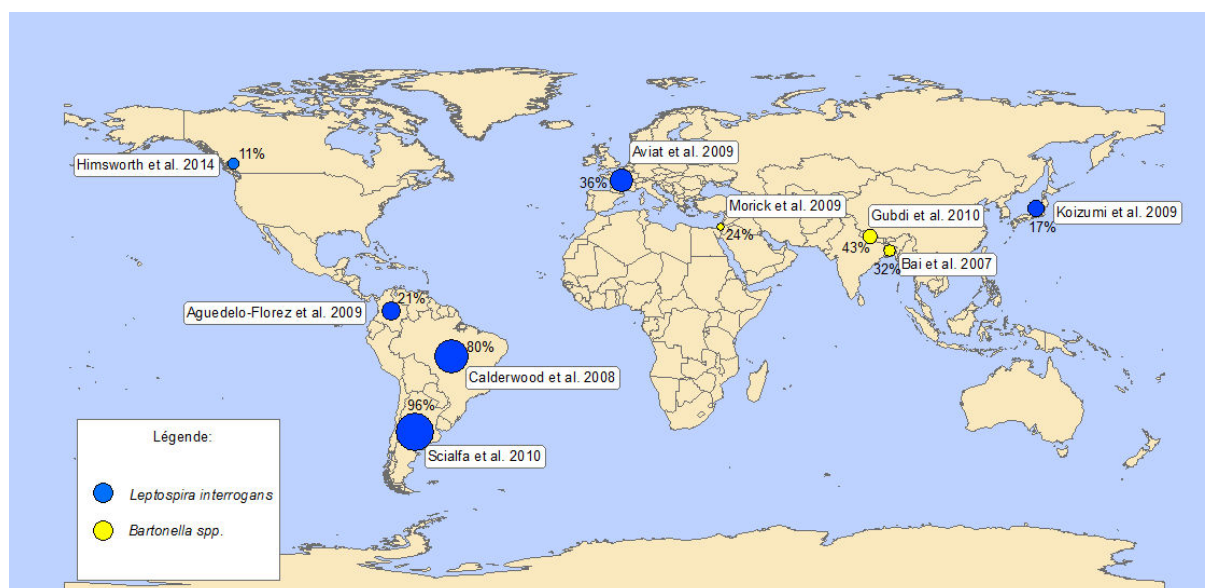
### L'habitat

Les ressources écologiques sont les principaux déterminants de la densité de rat en milieu urbain (Feng *et al.*, 2013; Himsworth *et al.*, 2013c). Les populations de rats ont besoin d'un abri et de nourritures afin de s'établir. Ces critères caractérisent le milieu urbain, ce qui y rend difficile l'identification précise d'un habitat optimal du rat. Une étude récente décrit des facteurs sociaux (zones défavorisées, état des habitations) pour expliquer une densité élevée des rats (Himsworth *et al.*, 2014c). Le statut socio-économique d'une zone pourrait donc être un indicateur de la densité de rat et un indicateur de risque d'exposition à l'Homme.

## 2.1. Questions relatives à la persistance des agents pathogènes chez le rat surmulot

### 2.1.1. Distribution spatiale de la prévalence de ZAR

La prévalence de ZAR est variable sur le plan géographique, d'une ville à l'autre au sein d'un même pays (Liu *et al.*, 2010) ainsi qu'à l'échelle des quartiers d'une même ville (Koizumi *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2008). Par exemple, une étude à Vancouver (Canada) a montré que, la prévalence des rats infectés par les leptospires variait de 0% à 67% dans des zones d'un même quartier (Himsworth *et al.*, 2013c). À Copenhague, cette prévalence variait de 0% à 89% (Krøjgaard *et al.*, 2009). À Buenos Aires (Argentine), la séroprévalence du SEOV variait de 0% à 26% d'un site à l'autre de la même ville (Cueto *et al.*, 2008). Cette hétérogénéité de la prévalence (Figure 3) montre qu'il ne peut y avoir d'indicateur de risque à l'échelle d'une ville ou a fortiori d'une région, voire d'un pays ce qui complique considérablement la prise de décisions de santé publique.



**Figure 3 – Distribution spatiale de la prévalence des rats (*R. norvegicus*) infectés par *Leptospira interrogans* basée sur la culture et par *Bartonella spp.* basée sur la culture et/ou la PCR.**

La majorité des connaissances sur les ZAR résultent d'études ponctuelles, portant sur des sondages opportunistes d'individus capturés de façon souvent fortuite. L'hétérogénéité des prévalences pourrait être liée à la méthodologie des études, en particulier à des biais d'échantillonnage. Ces derniers

limiteraient l'intérêt de comparer des études qui traitent l'exposition de l'Homme aux ZAR. En outre, l'effectif de la population source de rats n'étant pas connu, la possibilité d'évaluer la puissance de ces résultats est limitée.

Les facteurs épidémiologiques qui déterminent cette hétérogénéité ne sont pas suffisamment définis par les publications épidémiologiques. Ils pourraient être liés à l'écologie des rats et principalement à l'occupation du domaine vital (Traweger *et al.*, 2006). Pour les zoonoses transmises de façon indirecte, notamment par la contamination de l'eau, des facteurs abiotiques (rayonnement, déplacements d'air, circulation de l'eau) pourraient aussi influencer la prévalence chez les humains exposés à ces facteurs (Traweger et Slotta-Bachmayr, 2005). Une meilleure compréhension de la distribution des ZAR se base sur une connaissance de la relation hôte – pathogène – environnement. L'état des lieux de ces connaissances est développé dans les paragraphes suivants.

#### 2.1.2. Relation hôte – pathogène

##### **Morbidité et mortalité dues aux agents de ZAR sur le rat surmulot**

Hormis l'infection par *Y. pestis*, la majorité des agents de ZAR ne provoque pas de manifestations cliniques chez les rats (Easterbrook *et al.*, 2007; de Faria *et al.*, 2008; Guerra, 2009; Ko *et al.*, 1999; Tucunduva de Faria *et al.*, 2007). De plus, la physiopathologie de ces infections chez les rats témoigne d'une adaptation particulière pathogène-hôte puisque les lésions tissulaires et la réponse immunitaire sont elles-mêmes limitées. Par exemple, une étude comparant au microscope le tissu rénal de rats infectés par *Leptospira* à celui de rats sains n'a pas mis en évidence de différences (Tucunduva de Faria *et al.*, 2007). L'absence de séroconversion détectable lors d'infection par *Leptospira* spp., *Mycobacterium bovis* ou *Bartonella* spp. est également décrite (Agudelo-Flórez *et al.*, 2009; Aviat *et al.*, 2009; Breitschwerdt et Kordick, 2000; Clarke *et al.*, 2007; de Faria *et al.*, 2008; Villanueva *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'infection par SEOV est persistante malgré la présence d'anticorps neutralisants (Kariwa *et al.*, 2007), le système immunitaire du rat permet le maintien et l'excrétion des virus (Easterbrook *et al.*, 2007). Dans le cas de *Streptobacillus moniliformis*, la bactérie est décrite comme faisant partie de la flore commensale de l'oropharynx du rat (Elliott, 2007; Gaastra *et al.*, 2009). Ces caractéristiques font du rat un réservoir efficace pour la dissémination d'agents pathogènes dans l'environnement qui permet leur transmission à l'Homme et aux animaux domestiques.

### **Variabilité d'incidence avec l'âge et le poids**

Les populations animales sont structurées en classes de sexe et d'âge, dont la détermination précise est difficile dans les populations naturelles sauvages. En tant qu'indicateur de l'âge du rat, le poids est la variable la plus fréquemment utilisée pour analyser les données sur l'écologie des ZAR (Agudelo-Flórez *et al.*, 2009; Easterbrook *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2004; Krøjgaard *et al.*, 2009). Cependant, le poids n'est pas exclusivement associé à l'âge; la population d'origine, l'état de santé et l'accès aux ressources peuvent également impliquer sa variation (Clapperton, 2006; Glass *et al.*, 1988; Hickman et Swan, 2010) et complexifient l'interprétation de l'effet pondéral sur le portage microbien.

La probabilité qu'un rat soit porteur de *Leptospira* pathogènes, SEOV ou HEV augmente avec l'âge (Bharti *et al.*, 2003; Cueto *et al.*, 2008; Krøjgaard *et al.*, 2009; Vanasco *et al.*, 2003) en relation avec une augmentation des opportunités d'exposition (maladies contagieuses). La prévalence des agents pathogènes diminue avec la proportion de jeunes dans la population, en effet, les rats quittant le nid et entrant dans la population ont été peu exposés et sont peu infectés à ce stade (Liu *et al.*, 2010). Ces éléments suggèrent donc que les populations de rats bien établies, sexuellement matures et stables seraient les plus à risque d'exposer l'Homme aux ZAR.

### **Variabilité d'incidence avec le comportement social**

Le comportement social (contacts agressifs, coïts) influence la transmission des agents pathogènes, cependant ces effets sont difficiles à déterminer lors d'études ponctuelles par sondage. Un indicateur d'agression intra spécifique est le nombre de morsures visibles. Une association entre le nombre de morsures cutanées et l'infection par SEOV a été mise en évidence chez des rats urbains (Hinson *et al.*, 2004) et confirmée par Costa *et al.* 2014 sans être pour autant robuste après l'ajustement de cet effet sur le sexe des rats. De tels résultats peuvent indiquer la transmission du virus par la morsure ou suggérer que les morsures sont le reflet de caractéristiques (comportementales ou physiologiques) de l'individu.

#### **2.1.4. Relation hôte – pathogène – environnement**

L'écologie des rongeurs est le principal déterminant de la dynamique des agents zoonotiques au sein des populations de rongeurs et du risque de leurs transmissions à l'Homme (Davis *et al.*, 2005). Une meilleure compréhension de l'épidémiologie des zoonoses dans les populations de rats est essentielle

pour identifier les caractéristiques écologiques des populations de rats pouvant servir d'indicateur du risque sanitaire, et permettre ainsi de mettre en place une surveillance des ZAR fondée sur le risque d'exposition au réservoir. Si des connaissances sont disponibles sur l'influence de l'environnement sur la dynamique des populations, peu de paramètres sont déterminés sur la place de l'environnement dans la triade hôte – pathogène – environnement.

### **Effet de la saison**

La saison a une influence sur la dynamique des populations de rongeurs sylvatiques (influence sur l'environnement et de fait, les ressources) et, secondairement, sur la dynamique des pathogènes (Olsson *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2012). L'incidence de la FHSR associée à SEOV en Chine est maximale en avril et minimale en septembre (Guan *et al.*, 2009) et reflète la cyclicité de la dynamique des populations de rats ainsi que celle de l'exposition de l'Homme aux rats (Guan *et al.* 2009).

Dans l'environnement urbain, les populations de rats sont principalement sous l'influence de l'Homme et de son habitat, par conséquent les effets de la saison seraient moins prononcés qu'en milieu sylvatique. Les études sur l'effet de la saison dans les écosystèmes urbains sont controversées (Cueto *et al.*, 2008; Easterbrook *et al.*, 2005; Himsworth *et al.*, 2014c; Psaroulaki *et al.*, 2010). La méthodologie des études (*e.g.* méthode de capture, durée de l'échantillonnage) pourraient être responsable de ces controverses, laissant l'effet de la saison en milieu urbain sans conclusions abouties à ce jour.

## **2.2. Questions relatives à l'exposition des hommes**

### **2.2.1. Connaissances sur les facteurs de risque**

#### **Climat**

Que ce soit sous forme épidémique ou endémique, les ZAR sont répandues dans les pays en voie de développement plutôt que dans les pays industrialisés (Evangelista et Coburn, 2010). Cette distribution est plus probablement associée au climat, plus chaud et humide dans ces pays et qui favorise la transmission d'agents pathogènes tels que *Leptospira interrogans* et *Y. pestis* (Levett, 2001; Perry et Fetherston, 1997). En particulier, l'effet des événements climatiques tels que les variations de température, les typhons et les tsunamis sont décrits dans le sous-chapitre 2.3. Dans les pays tempérés comme la France, l'effet des variations locales ou ponctuelles du climat (par ex. l'effet de la saison ou de fortes pluies) sur le nombre de cas de leptospirose humaine n'a pas été mis en évidence (Baranton

et Postic, 2005); toutefois, l'hypothèse sous-jacente à l'augmentation sans précédent des cas, observée en France en 2013 et 2014, serait l'effet du changement climatique (Picardeau, 2015).

### **Milieu social**

Un des déterminants de ZAR pourrait être lié au niveau de revenu, et d'éducation qui sont tous deux associés à des zones d'habitations dites « défavorisées » (Johnson *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 1999, 2009). Par exemple, lors d'une épidémie de leptospirose au Brésil (Salvator), les habitants des bidonvilles avaient un risque d'infection quatre fois plus élevé que les autres habitants (Ko *et al.*, 1999). A Madagascar les personnes vivant dans des zones densément peuplées où les revenus sont faibles ont un risque accru d'être infectées par la peste bubonique (Boisier *et al.*, 2002).

Dans les pays industrialisés, le niveau de vie moyen est plus élevé que dans les pays cités précédemment, mais cette moyenne masque de profondes inégalités. Alors que les architectes et urbanistes développent des systèmes de protection contre les infestations murines (*e.g.* organisation de la collection des déchets, gestion de l'évacuation des eaux usées). Certaines populations dites « défavorisées » vivent dans de façon précaire et ne bénéficient pas de ces infrastructures. Ces conditions favorisent l'infestation par les rats, la proximité entre rats et habitants et de potentielles transmissions de ZAR (Boisier *et al.*, 1997). Seize p. cent (16%) des personnes habitant dans un quartier défavorisé de Baltimore (Etats-Unis) étaient séropositives pour *Leptospira spp* (Childs *et al.*, 1992) alors que l'incidence nationale est inférieure à 10 cas pour 100 000 personnes-année. La séropositivité était associée aux personnes dont le revenu était moindre ( $\leq 8000\$$  US/an). Dans une autre étude, des cas de leptospirose rapportés chez trois sans-abris de Baltimore étaient associés à une occupation de leur environnement par des rats porteurs (Vinetz *et al.*, 1996). En France, un cas suspecté de FHSR associée à SEOV était un sans-abri (Zeller *et al.*, 2005). Les populations défavorisées ayant un accès limité aux soins, il est probable qu'un nombre important de cas ne soient pas diagnostiqués, sous-estimant d'autant le risque (Chanteau *et al.*, 2000; Meerburg *et al.*, 2009).

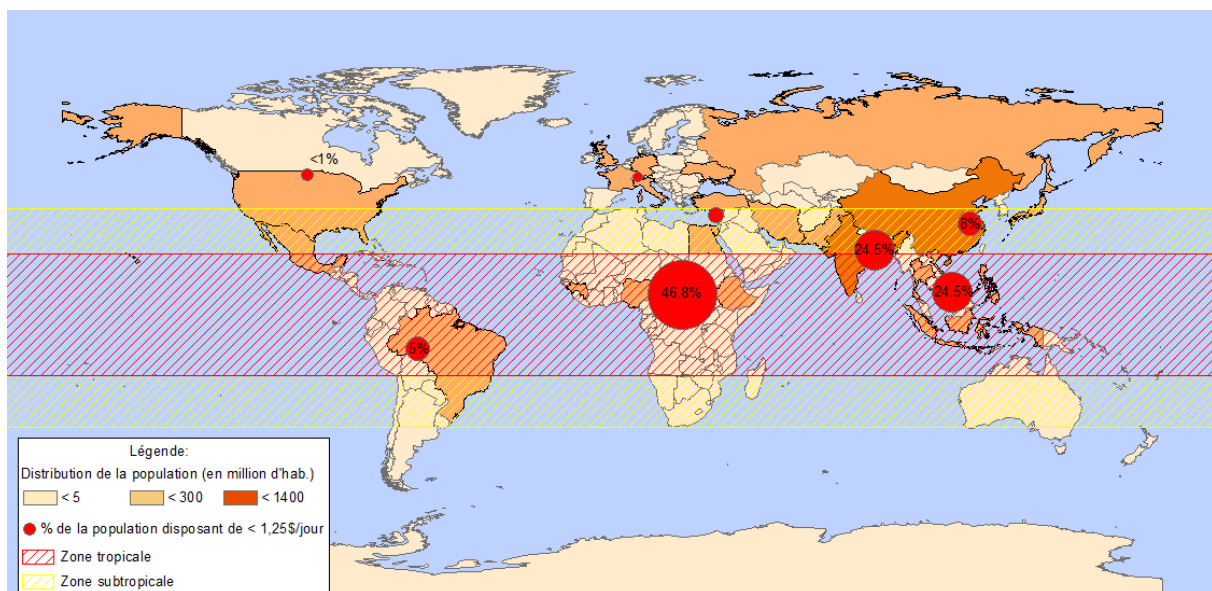
Bien que les personnes à moindre revenu aient un risque accru de ZAR, le statut socio-économique n'est pas le seul déterminant. À Tokyo (Japon), 13 cas de leptospirose autochtones ont été enregistrés entre 2002 et 2008. Les patients n'étaient pas associés à un milieu défavorisé mais rapportaient voir des rats dans leur environnement (Koizumi *et al.*, 2009). La présence de rat à proximité de son habitation est en effet un indicateur de risque d'infection (Bhardwaj *et al.*, 2008; Ko *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2008; Sarkar *et al.*, 2002).

## Exposition professionnelle

Certains professionnels ont une activité en lien direct ou indirect avec les rats (*e.g.*, garde- chasse, vétérinaires, égoutiers, laborantins, animaliers) et sont ainsi à risque d'exposition aux ZAR (Dremsek *et al.*, 2012; Shvartsblat *et al.*, 2004). L'observation d'infections par des hantavirus chez du personnel de laboratoire, y compris en France, (Kawamata *et al.*, 1987; Lee et Johnson, 1982; Umenai *et al.*, 1979; Vogt, 2010) souligne le risque d'exposition de cette population bien que les rats manipulés à des fins expérimentales soient dits « exempt d'organisme pathogène spécifique » (EOPS). Au-delà du personnel de laboratoire, les universitaires peuvent également être exposés lors de travaux pratiques impliquant des rats de laboratoire et représentent une large population à risque d'exposition si des agents zoonotiques sont présents (Weigler *et al.*, 2005).

## Conclusions

Le déterminant de ZAR est le contact direct ou indirect avec des rats infectés. Les populations dites « défavorisées » sont à risque d'infection de par les contacts plus fréquents avec des rats. Le risque d'infection est d'autant accru que le climat est chaud et humide, favorisant la persistance des agents dans l'environnement, par exemple, *Leptospira* et la transmission, par exemple *Y. pestis* (*cf.* §2.3.3). La distribution des populations exposées à ces facteurs sont représentées sur la figure 4.



**Figure 4 – Population à risque**  
(D'après les données de la banque mondiale<sup>3</sup> et des Nations Unies 2013<sup>4</sup>)

<sup>3</sup> <http://donnees.banquemondiale.org/theme/pauvrete>, consulté le 12/12/2014

### 2.2.2. Difficultés à mesurer la charge des ZAR

#### Impact sanitaire

Les ZAR incluent des agents pathogènes de nature diverse (c.à.d. virus, bactéries et parasites), pouvant affecter tous les organes. Les manifestations cliniques qui leur sont associées sont donc non spécifiques et par conséquent ne peuvent pas être catégorisées comme ZAR par des nomenclatures utilisées pour la surveillance clinique des maladies infectieuses (Bharti *et al.*, 2003; Boisier *et al.*, 1997; Civen et Ngo, 2008; Evangelista et Coburn, 2010; Gray *et al.*, 2007; Guerra, 2009; Perrocheau et Perolat, 1997). La surveillance des ZAR est le plus souvent passive, faite à partir des données enregistrées dans certains laboratoires, équipés pour effectuer des tests diagnostiques souvent non standards ou peu accessibles (Chanteau *et al.*, 2000; Elliott, 2007; Gaastra *et al.*, 2009). En France, la surveillance de la leptospirose est organisée (centralisation des données de certains laboratoires: Biomnis, Cerba et l'Institut Pasteur), notamment dans les départements et territoires d'outre-mer où l'incidence de la leptospirose est plus élevée (Baranton et Postic, 2005). Une étude menée dans les Antilles en 2011<sup>5</sup> illustre la variation de l'incidence leptospirosique avant et après sensibilisation des acteurs de santé pour cette maladie (Tableau 5). Dans les deux départements une incidence trois à quatre fois supérieure a été estimée après sensibilisation du corps médical local. Ces résultats mettent en évidence l'effet de la sensibilisation des acteurs de santé sur les indicateurs de l'impact sanitaire d'une maladie non spécifique telle que la leptospirose. Ils quantifient, en outre, une part de la sous-estimation des cas.

**Tableau 5 – Indicateurs de l'impact sanitaire de la leptospirose en France**  
métropolitaine, Guadeloupe et Martinique entre 2002 et 2008,  
et résultats de l'étude d'incidence aux Antilles 2011  
(Tirée de Cassadou *et al.* 2011)

	Nombre annuel moyen	Taux annuel moyen / 100 000 hab.
Guadeloupe 2002-2008	99,4	22,5
Martinique 2002-2008	54,8	13,9
Guadeloupe 2011	267 [183-351]	69,4 [47,6-91,1]
Martinique 2011	240 [144-337]	60,6 [36,3-85,0]

<sup>4</sup> [http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/development/pde\\_wallchart\\_2013.pdf](http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/development/pde_wallchart_2013.pdf), consulté le 12/12/2014

<sup>5</sup> [http://opac.invs.sante.fr/doc\\_num.php?explnum\\_id=8763](http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnum_id=8763) consulté le 16/03/2015



L'absence de spécificité des manifestations cliniques et le manque d'information auprès des acteurs de la santé peut impliquer une sous-estimation des cas de ZAR (Bharti *et al.*, 2003; Guerra, 2009; Silpapojakul *et al.*, 1993; Vinetz *et al.*, 1996; Yanagihara *et al.*, 2007).

Le sous-diagnostic entraîne l'absence ou le retard de mise en place d'un traitement approprié; des maladies curables peuvent ainsi devenir mortelles (Chanteau *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 1999) ou chroniques (Ko *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2010; Yanagihara *et al.*, 2007). La sous-estimation de l'incidence qui en résulte implique un manque de considération des ZAR par les gestionnaires du risque en santé publique à l'instar du retrait de *Leptospira* de la liste des dangers sanitaires en 1987. La leptospirose n'est plus à déclaration obligatoire en France ce qui contribue à la difficulté d'évaluation de la charge de la maladie.

### **Impact économique**

Certaines ZAR, comme les infections par *Leptospira* spp. affectent les animaux de production (c.à.d. ruminants et porcins), et entraînent des pertes de production pour l'éleveur. Au-delà de l'impact sanitaire, ces ZAR ont donc un effet sur l'économie tant à l'échelle de l'élevage qu'à l'échelle du pays. La quantification de l'impact économique de ces maladies serait un outil essentiel pour la gestion des élevages. Les dépenses associées à des maladies animales impossibles à catégoriser sur le plan clinique sont souvent sous-estimées par un défaut d'identification des pertes de production réellement attribuables à l'infection. La leptospirose chez les animaux de rente compte parmi ces maladies dont l'impact économique est difficile à évaluer et probablement sous-estimé.

Deux études menées dans le cadre de la résidence en Santé Publique Vétérinaire et présentées dans les articles en annexes 2 et 3 tendaient à évaluer cet impact économique de la leptospirose en élevage bovin (*cf.* encadrés ci-après).

**La leptospirose bovine dans les cheptels en France,  
impact économique de l'infection.**

Bulletin des GTV. 2013, 69: 61 – 67

Florence Ayral

**Prélude** – En France, la séroprévalence des *Leptospira* pathogènes dans les cheptels bovins laitiers, varie de 21% à 35% selon les études (André-Fontaine *et al.*, 2010; Tresse *et al.*, 2009). Les conséquences de l'infection se distinguent selon le statut de l'élevage vis-à-vis des Leptospires. Parmi les élevages infectés, la forme enzootique est la plus répandue; elle est due à l'infection chronique par *Leptospira* sérovar hardjo chez une partie des bovins et se manifeste à l'échelle du troupeau par une diminution de la fertilité (André-Fontaine et Kodjo, 2009). En revanche, dans les élevages naïfs pour *Leptospira* quel que soit le sérovar infectant, la fièvre, des avortements et des chutes de production laitières sont observés. Le tableau clinique de la maladie, fruste et non spécifique entrainerait une sous-estimation des cas et de l'impact économique de la maladie.

**Résumé** – Le coût relatif à un avortement ne se limite pas à la valeur du veau mort, il doit prendre en compte un certain nombre pertes indirectes (gestion du *post-partum*, conséquences sur la lactation, dépréciation de la vache, baisse de fertilité), voire de gains (alimentation non distribuée). Dans notre analyse, la méthode des budgets partiels a permis d'estimer une perte financière annuelle liée aux dommages de l'infection (c.à d. avortement leptospirosique) de 88 € à 2369 € selon la gestion de l'éleveur.

Outre l'appui à la décision de l'éleveur, cette analyse est une étape préalable à l'évaluation économique des mesures de lutte contre la leptospirose.

**La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France,  
établir un programme de lutte.**

Bulletin des GTV. 2014, 73: 111-119

Florence Ayrat

**Résumé** – Dans cette étude, nous nous sommes basés sur l'estimation préalable de l'impact économique de la maladie afin de comparer le coût (ou le bénéfice) associé à l'utilisation de l'antibiothérapie et de la vaccination lors de lutte contre la leptospirose bovine. Dans l'exemple développé (avortement leptospirosique avec remplacement du veau mort et réforme et remplacement de la vache avortée), l'antibiothérapie et la vaccination étaient rentables en-deçà de 14 et 428 individus traités respectivement. La vaccination contre l'infection par le séro groupe Sejroe, qui est la seule valence vaccinale disponible chez les bovins, était l'alternative la plus rentable. Les infections par le séro groupe Séjroe n'étant qu'une partie des leptospiroses bovines, la disponibilité de vaccins multivalents permettraient de fournir une protection optimisée des cheptels bovins en France.

En plus des arguments sanitaires, notre étude souligne des arguments économiques en faveur du développement des connaissances sur la leptospirose bovine. Peu d'alternatives sont aujourd'hui disponibles tant pour le dépistage de *L. interrogans* chez les bovins (faible sensibilité et spécificité du test de référence) que pour les mesures de lutte. Cette situation limite les initiatives nationales et internationales pour la gestion de la leptospirose dans la filière bovine. Une amélioration du test diagnostique et des options préventives pourrait inverser cette tendance à l'avenir.

## 2.3. Perturbations de l'environnement mondial et le risque d'émergence de ZAR

### 2.3.1. Modification de l'exposition aux ZAR

Certains changements de tendances épidémiologiques des ZAR sont constatés; en particulier, l'augmentation de l'urbanisation et la concentration de personnes issues de milieux défavorisés dans des zones urbaines dépourvues d'infrastructures sont à l'origine de flambées de ZAR. Par exemple, la leptospirose a longtemps été considérée comme une maladie de loisir (*e.g.* triathlon, kayak) et professionnelle (*e.g.* égoutier, éboueur, garde-chasse, vétérinaire) (Baranton et Postic, 2006), désormais l'augmentation de l'incidence de la leptospirose urbaine est rapportée dans différentes parties du monde, y compris en France (Evangelista et Coburn, 2010; Ko *et al.*, 1999; Socolovschi *et al.*, 2011). De même, l'incidence de la fièvre hémorragique avec syndrome rénal (FHRS) provoquée par le virus Séoul augmente dans les agglomérations en Chine (Guan *et al.*, 2009) et une résurgence de la peste est observée dans les villes de Madagascar depuis les années 1980 (Chanteau *et al.*, 2000; Migliani *et al.*, 2006). Ce phénomène serait lié à l'aire de répartition des rats, étroitement associée aux activités humaines qui, combinée à l'augmentation du taux d'urbanisation favorise les contacts entre le rat et l'Homme.

Pour d'autres raisons, certaines zoonoses autrefois associées au milieu urbain semblent apparaître en milieu rural. Par exemple, le typhus murin (infection par *Rickettsia typhi*) décrit en milieu urbain au Etats-Unis (Azad *et al.*, 1997; Comer *et al.*, 2001; Gikas *et al.*, 2002; Silpapojakul *et al.*, 1993) est également décrit en milieu rural avec des infections *via* les puces de chats et d'opossums (Azad *et al.*, 1997; Civen et Ngo, 2008). Désormais en Nouvelle-Zélande, l'exposition de l'Homme à *R. typhi* est plus souvent associée aux rats en milieu rural (Gray *et al.*, 2007).

Dans les paragraphes qui suivent nous examinons les facteurs qui nous semblent particulièrement importants à étudier pour être en mesure de comprendre les risques sanitaires liés aux rats et ainsi mieux cibler les besoins de l'épidémiosurveillance des ZAR.

### 2.3.2.Modifications de l'environnement et urbanisation

Mills, en 2005, a montré que la séroprévalence d'hantavirus chez les rongeurs était inversement proportionnelle à la diversité des espèces de rongeur présentes. Les modifications anthropiques de l'habitat peuvent être responsables d'une perte de diversité et de la colonisation de certaines espèces invasives comme le rat surmulot. Ces modifications environnementales peuvent alors favoriser l'émergence ou la réémergence d'agents zoonotiques tels que les hantavirus (Mills, 2005). L'agrandissement des villes implique l'occupation des espaces naturels périphériques et un potentiel contact accru entre la faune sauvage présente et l'Homme, au moins lors de la phase initiale du processus. Cette proximité favorise la transmission d'agents pathogènes émergents de l'animal vers l'Homme mais aussi de l'Homme vers l'animal (Thompson *et al.*, 2009). Ce dernier aspect est souvent négligé mais peut poser un réel problème de santé publique lorsque les animaux exposés deviennent réservoir d'agents pathogènes humains.

En outre, l'urbanisation (estimée à 65% en 2025<sup>6</sup>) implique l'augmentation de personnes vivant en étroite promiscuité et favorise la transmission densité-dépendante des agents pathogènes contagieux. Le milieu urbain est particulièrement problématique concernant l'émergence et la réémergence des maladies infectieuses que ce soit dans les pays en voie de développement ou dans les pays industrialisés (Gratz, 1999). En tant que source de zoonoses, le rat urbain nécessiterait donc une surveillance particulière.

### 2.3.3.Changement climatique

#### **Climat**

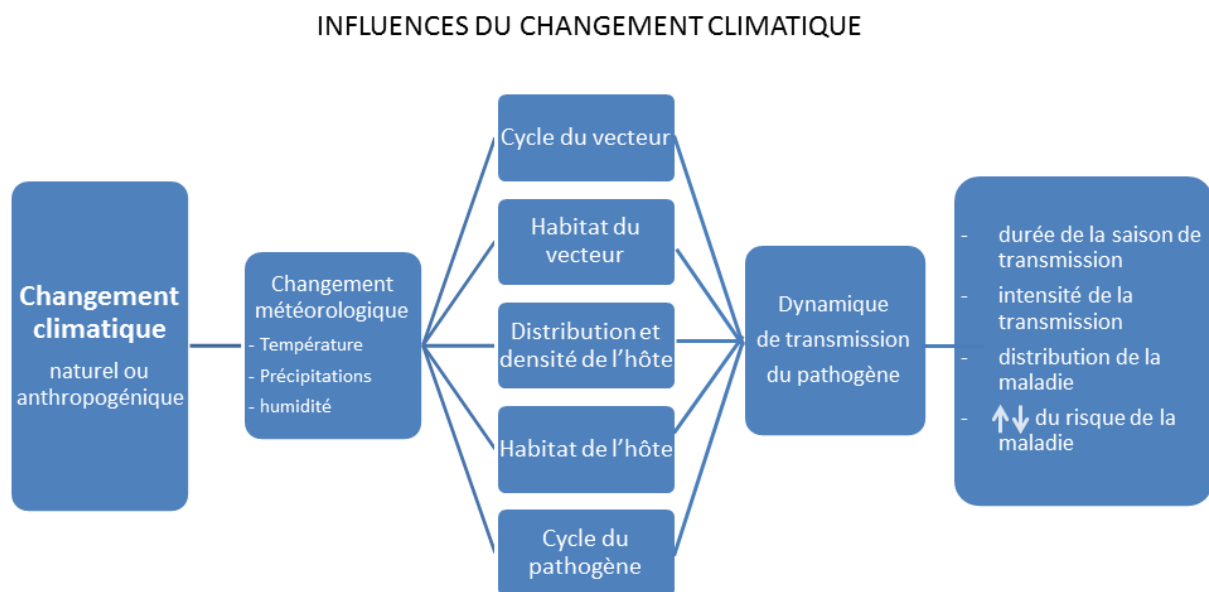
Le changement climatique est un facteur évoqué dans le phénomène d'émergence (Jones *et al.*, 2008). Bien qu'il soit difficile à évaluer, l'influence du climat est décrite sur la distribution des arthropodes vecteurs (Lafferty, 2009) ainsi que sur les vertébrés réservoirs de zoonoses, tels que les rongeurs (Gubler *et al.*, 2001). Chez certains de ces derniers, le changement climatique est à l'origine d'une diminution des ressources alimentaires végétales et perturbe de ce fait la dynamique des populations

---

<sup>6</sup> Données de l'Organisation des Nations Unies

(Ruffino *et al.*, 2013). Certaines populations de rongeurs pourraient disparaître, laissant ainsi une niche écologique disponible pour d'autres espèces. Les rats sont des espèces anthropophiles avec une forte capacité d'adaptation aux changements environnementaux lorsque l'Homme couvre (à son insu) leurs besoins fondamentaux. Ils seraient donc capables de proliférer dans ces niches écologiques laissées vacantes et favoriser la présence des agents zoonotiques pour lesquels ils sont réservoirs (Mills *et al.*, 2010).

L'impact du changement climatique reste toujours controversé. Cependant il pourrait influencer l'écologie des ZAR de différentes façons notamment en modifiant la dynamique des populations de rats ou de vecteurs, les voies de transmission et la charge pathogène du rat ou des vecteurs (Mills *et al.* 2010) (Figure 5).



**Figure 5 – Influence du changement climatique**  
effets sur l'émergence de zoonoses associées aux rats,  
d'après Gubler *et al.* 2001 et Mills *et al.* 2010.

Dans ce contexte, une étude présente la leptospirose comme l'une des six maladies dont la répartition géographique serait modifiée par les changements en cours (Dufour *et al.*, 2008). L'incidence et la distribution de certaines ZAR sous l'influence du climat est détaillé ci-après:

### *Influence des précipitations*

Les conditions météorologiques jouent un rôle dans l'écologie des ZAR par leurs effets sur l'exposition de l'Homme aux micro-organismes et également sur la biologie et l'écologie des rats, des vecteurs et des agents pathogènes (Gubler *et al.*, 2001). Dans le cas de *Leptospira* spp., les fortes pluies et les crues favorisent la dispersion des rats et la persistance des bactéries dans le milieu, augmentant ainsi le contact potentiel entre l'Homme et la bactérie (Evangelista et Coburn, 2010). L'incidence de la leptospirose est, en effet, plus élevée dans les régions tropicales lors de la saison des pluies (Ko *et al.*, 1999; Venkataraman et Nedunchellian, 1992). De même, des études en milieu urbains d'Amérique du sud ont montré que les cas humains de leptospirose étaient associés à la proximité des points d'eau ou des zones inondables (Barcellos et Sabroza, 2001; Bhardwaj *et al.*, 2008; Evangelista et Coburn, 2010; Guerra, 2009; Reis *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2010; Tassinari *et al.*, 2008).

Une des conséquences du changement climatique, fréquemment citée en exemple, est l'augmentation du phénomène El Niño qui associe, en Amérique du Sud une augmentation de la température et d'humidité. Le nombre d'épidémies de leptospirose est associé à ce phénomène (Weinberger *et al.*, 2014).

### *Influence de la température*

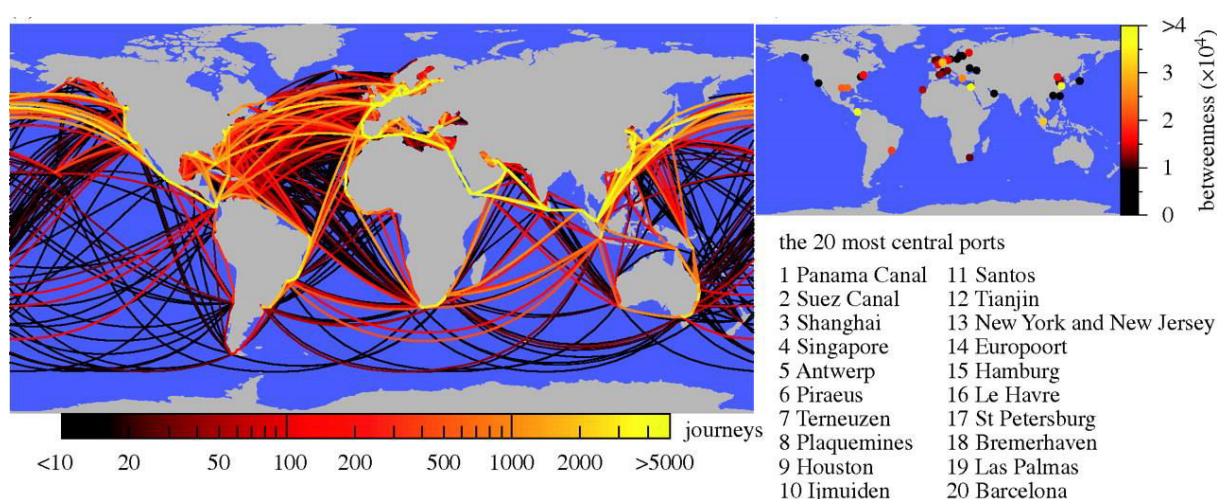
Le changement climatique est souvent évoqué comme cause favorisante de la multiplication des vecteurs de maladies. Plusieurs exemples vont dans ce sens dans le cas de maladies transmises par des diptères (Githeko *et al.*, 2000). Il semble cependant que la relation soit plus complexe, notamment dans le cas des maladies à transmission par les tiques (Randolph, 2003). Pour les maladies transmises par les rats, ce type de vecteurs ne semble pas jouer de rôle significatif. Dans le cas de la peste en revanche, un environnement chaud serait nécessaire pour déclencher la transmission de *Y. pestis* par la piqûre de puce. Cavanaugh, 1971 émettait l'hypothèse de l'expression de gènes dépendant de la température et impliquant l'agglutination de bactérie dans le système digestif puis le blocage du pro-ventricule des puces. Ce phénomène est à l'origine du dépérissement de la puce qui pique pour tenter de se nourrir et libère des bactéries à chaque piqûre contaminant ainsi son hôte. Hinnebusch *et al.*, 1998 ont ensuite réfuté cette hypothèse mais confirment néanmoins le blocage du pro ventricule entre 20°C et 30°C. Le mécanisme de blocage du pro ventricule est mal connu mais semble faire intervenir des températures chaudes et serait une des raisons du maintien endémique de la peste dans les environnements chauds (Perry et Fetherston, 1997). Le changement climatique pourrait alors modifier

la dispersion de la maladie dans le monde et l'éventuelle réapparition de la peste en Europe ne peut être exclue.

#### 2.3.4. La Mondialisation des échanges: les déplacements de personnes et d'animaux

Des exemples récents (SARS, HPAI H5N1) ont montré que l'importance et la rapidité des déplacements jouent un rôle majeur dans la dissémination des maladies infectieuses. Lors de l'épidémie de grippe H1N1, quatre semaines après les premiers cas décrits aux Etats-Unis, l'infection était rapportée dans quarante-et-un (41) pays (Wang et Palese, 2009). En plus des déplacements de l'Homme, environ 37 millions d'animaux vivants (bovins, porcs, moutons, chèvre et chevaux) circulent tous les ans dans l'Union Européenne<sup>7</sup> et contribuent au risque de dissémination des agents pathogènes par le transport direct d'individus infectés ou indirecte de vecteurs porteurs.

Historiquement, la présence d'hantavirus Séoul en Europe était considérée comme anecdotique et suspectée de résulter de l'introduction sporadique de rats surmulots *via* les ports (Vaheri *et al.*, 2013). Les ports du monde sont reliés les uns aux autres par un important réseau de transport maritime et le port du Havre est l'un des plus importants en terme d'échange (Figure 6). Ce dernier est un point d'entrée potentielle d'agents pathogènes exotiques.



**Figure 6 – Trajectoire des cargos en 2007**  
et localisation des principaux ports du monde (Kaluza *et al.*, 2010)

<sup>7</sup> [http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/transport/docs/10112011\\_report\\_fr.pdf](http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/transport/docs/10112011_report_fr.pdf) consulté le 25/01/2015



Les premiers cas de FHSR ont récemment été décrits en Europe. Ce point d'actualité a fait l'objet d'un article de synthèse dont le texte est intégralement rapporté en annexe 4 et résumé dans l'encadré ci-dessous). Dans ce contexte, Dupinay *et al.*, 2014 ont caractérisé les hantavirus Séoul détectés chez des rats en France, il en résulte leur proximité génétique avec des virus préalablement décrits en Asie. Les échanges commerciaux, en particulier maritimes, pourraient être à l'origine de cette dispersion.

### **Les Hantaviroses à Virus Séoul:**

#### **émergence d'une zoonose chez les rats en Europe.**

Point Vét. 2013, 336: 14 – 18

Florence Ayrat

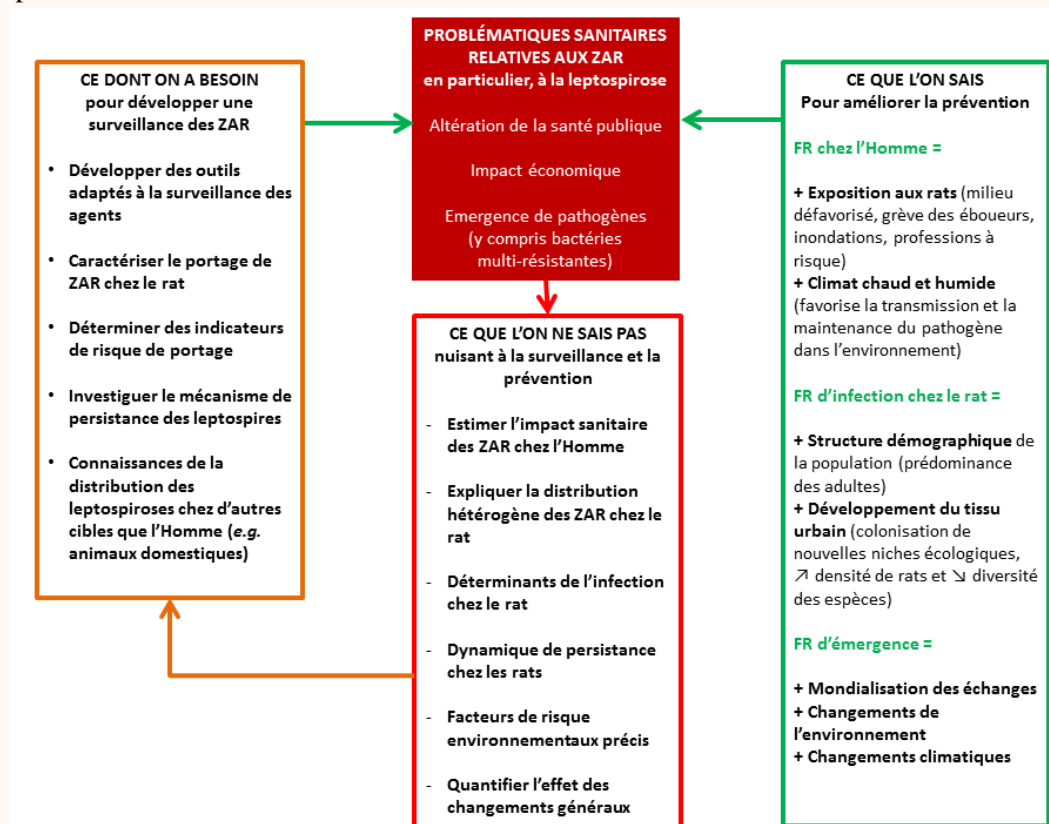
**Résumé** – Les hantaviroses sont des zoonoses virales dues aux *Hantavirus* (famille des *Bunyaviridae*) dont les manifestations cliniques, potentiellement fatales, concernent en moyenne 200 000 patients chaque année dans le monde. Actuellement, plus de quarante *Hantavirus* sont identifiés, parmi lesquels le virus Séoul (SEOV) associé à la découverte récente de souches pathogènes en Europe (la forme la plus fréquente d'hantavirose en France est due au virus Puumala). Les rats, dont le surmulot (*Rattus norvegicus*), sont les réservoirs du SEOV. Cette synthèse présente un point d'actualité sur l'impact et les enjeux en santé publique des infections par les *Hantavirus*, en se focalisant sur l'émergence récente de SEOV pathogène pour l'homme chez les rats sauvages et domestiques en Europe.

#### 2.3.5.Effets associés à l'usage massif des antibiotiques

Des bactéries résistantes à la pénicilline ont récemment été détectées chez le rat (Himsworth *et al.*, 2013b, 2014a). La présence de ces bactéries pourrait être issue d'un transfert depuis une source humaine ou d'élevage. Le rat est particulièrement exposé aux déchets humains dont les rejets d'antibiotiques, ces derniers favoriseraient potentiellement la persistance ou l'apparition de résistances de la flore murine. *A contrario*, si ces bactéries, leurs plasmides, voire leur ADN peuvent persister dans les populations de rats, elles pourraient contaminer des sources de denrées ou de produits et infecter en retour des humains, et plus probablement des animaux d'élevage.

## Résumé du chapitre 2

L'Homme, le rat surmulot et les agents pathogènes sont en interaction au sein d'un même biotope. Tout changement dans ce biotope implique des réajustements pouvant aboutir à l'augmentation de l'incidence des zoonoses associées aux rats et à l'émergence de pathogènes. La figure 7 synthétise les problématiques sanitaires, les connaissances disponibles pour y faire face, les facteurs limitant leur meilleure maîtrise et propose des voies d'amélioration des connaissances et de la situation sanitaire. La leptospirose étant un problème sanitaire associé aux rats important dans le monde y compris en France (cf. chapitre 1), une attention particulière est portée sur cette maladie.



**Figure 7 – Synthèse des problématiques relatives aux ZAR**  
(en particulier la leptospirose) et bilan des connaissances

FR: Facteur de risque



PROBLÉMATIQUES

ET OBJECTIFS DE LA THÈSE



## PROBLÉMATIQUES

La surveillance épidémiologique (*i.e.* épidémiosurveillance) vise à informer les autorités sanitaires et à guider leurs actions sanitaires (*cf.* encadré ci-dessous). Elle a trois objectifs: décrire la distribution de maladies et de phénomènes de santé, alerter lors de risques nouveaux ou de changements de tendance, évaluer l'efficacité des dispositifs de contrôle ou de prévention. En France, l'épidémiosurveillance est institutionnellement confiée à l'INVS<sup>8</sup> pour la santé humaine, et à la Plateforme ESA<sup>9</sup> pour la surveillance des maladies animales; de nombreuses zoonoses sont ainsi surveillées grâce aux données des laboratoires de diagnostic et de recherche. Une recrudescence de cas humains permet d'alerter les décideurs de santé pour la mise en place de mesures de prévention (Mailles *et al.*, 2005, 2010). Cependant ce dispositif est seulement réactif et ne permet pas d'anticiper l'apparition de nouvelles maladies chez l'Homme (maladies émergentes) ou de prévoir des changements de tendance.

Bien que les rongeurs soient considérés comme l'un des taxons les plus menaçants pour la santé humaine (espèces invasives et réservoir zoonotique) (Begon, 2003; Morand *et al.*, 2015), ni en Europe, ni dans une autre partie du monde, un dispositif est en place pour la surveillance des ZAR à la source des cas humains, soit au niveau du réservoir murin, soit au niveau des hôtes de liaison domestiques. Une épidémiosurveillance ciblant les populations de rats ou les animaux domestiques exposés à des matières virulentes émises par les rats (par ex. *L. interrogans*) nous a donc semblé poser des questions de recherche à la fois innovantes, pertinentes et utiles.

La principale finalité de nos études ciblait la faisabilité d'une surveillance des zoonoses portées, entretenues et transmises à l'homme par les rats et certaines espèces animales domestiques. Notre travail a consisté à conduire des investigations de terrains, visant essentiellement à collecter sur des rats capturés dans le Rhône, des échantillons de tissus, afin de mettre en œuvre des techniques de dépistage pour décrire et analyser la prévalence d'agents zoonotiques. En outre, à l'aide de données rétrospectives de diagnostic disponibles chez des espèces domestiques, en France, nous avons exploré la possibilité que ce type de données permettent également d'analyser la distribution du risque d'exposition de l'homme à un agent choisi comme représentant un risque sanitaire majeur en France, *Leptospira interrogans* (*sensu largo*). La description et l'analyse de la distribution des ZAR chez les

---

<sup>8</sup> <http://www.invs.sante.fr/> consulté le 07/03/2015

<sup>9</sup> <http://www.plateforme-esa.fr/>

rats et chez les animaux domestiques permettront une meilleure compréhension de l'épidémiologie et une meilleure maîtrise de ces maladies.

Développer la veille sanitaire des populations murines (*i.e* déterminer les facteurs, les indicateurs et les zones à risque) pourra permettre d'améliorer l'information des professionnels de santé, de diminuer le sous-diagnostic et d'adapter les méthodes de prévention à l'hétérogénéité des situations d'exposition. Une surveillance efficacement ciblée favorisera la détection précoce des émergences ou réémergence de ZAR. Enfin, une meilleure connaissance de la dynamique de transmission et de persistance des agents pathogènes dans les populations de rats sera un appui au développement des stratégies de contrôle des populations de rats afin diminuer la force d'infection et de prévenir la transmission de ces maladies à l'Homme.

### ***Définition de l'épidémiosurveillance***

Malgré les attentes d'épidémiologistes et de modélisateurs il est peu probable que l'on arrive à prévoir où et quand le prochain agent de zoonose va émerger (Murphy, 2008). Les surveillances précoces sont donc essentielles pour détecter le plus tôt possible les agents pathogènes dont la prévalence augmente et exposent les populations à de nouveaux dangers.

L'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) définit la surveillance comme *«les opérations systématiques et continues de recueil, de compilation et d'analyse des informations zoosanitaires, ainsi que leur diffusion en temps opportun aux responsables afin qu'ils puissent prendre les mesures qui s'imposent.»* [Code sanitaire pour les animaux terrestres, Volume 1, p. 23, consulté en ligne le 07/03/2015]. La surveillance permet de recueillir des indicateurs du statut des populations animales ou humaines, selon les cas, pour des maladies tant endémiques qu'exotiques (objectif descriptif), de détecter des situations définies comme anormales (objectif d'alerte) et d'appuyer les décisions nationales et internationales en santé publique. Enfin, la surveillance permet d'apprécier les effets des politiques et des stratégies de lutte et de prévention (objectif d'évaluation).

## QUESTIONS DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DÉTAILLÉS

Les questions de recherche que nous avons documentées s'articulaient à deux hypothèses, (1) l'application d'outils moléculaires nouvellement adaptés pour la détection d'agents zoonotiques chez le rat permettrait de développer la veille sanitaire des populations murines et d'assurer la surveillance des ZAR en France; (2) dans le cadre de ZAR multi-hôtes à l'instar de la leptospirose, l'utilisation des données diagnostiques de laboratoire chez les animaux domestiques permettrait d'apporter des informations épidémiologiques pertinentes pour la maîtrise de la maladie animale et humaine.

- mettre en œuvre des tests de détection nouvellement adaptés à la surveillance des ZAR chez le rat

À partir d'un échantillonnage de rats capturés dans le Rhône, incluant Lyon, des méthodes préalablement développées à des fins de surveillance chez cette espèce (c.à.d. la PCR pour détecter les virus de l'hépatite E, le «multispacer sequence typing» pour détecter les souches circulantes de *Leptospira interrogans*, le séquençage massif pour détecter et caractériser les hantavirus Séoul et la détection multi-pathogènes par la micro-puce à ADN développée dans le cadre du projet WildTech ont été appliquées.

- déterminer la prévalence relative des ZAR chez le rat et l'intérêt des tests de détection mis en œuvre

À partir d'un échantillonnage de rats surmulots, différentes méthodes de détection chez le rat (conventionnelles et nouvellement appliquées chez cette espèce) ont été utilisées pour révéler la présence d'agents pathogènes. Une comparaison des résultats obtenus par des méthodes éprouvées et les méthodes nouvellement appliquées, a conduit à discuter leur intérêt à des fins de surveillance épidémiologique.



- rechercher des indicateurs de risque de ZAR sur des sites appropriés dans le département du Rhône et caractériser le risque de ZAR chez le rat

La distribution spatiale des infections détectées chez les rats du Rhône a été décrite et analysée afin de définir les zones à risque de portage. Puis, à partir du portage des agents pathogènes zoonotiques, le risque d'être infecté a été caractérisé selon des critères morphométriques (risque d'infection en fonction de l'âge et du sexe parmi d'autres variables). Les zones à risque de présence ont été ensuite caractérisées selon des indicateurs socio-économiques liés à l'habitat humain.

- modéliser la persistance de l'infection par *Leptospira interrogans* dans une population théorique de rats

Ce travail synthétique a constitué l'élément final de nos investigations sur la source (*Rattus norvegicus*) et visait à obtenir une meilleure compréhension du mécanisme de persistance des leptospires dans les populations de rats et du niveau d'infection selon la structure et l'environnement de la population.

À partir des données de la littérature sur la dynamique des populations de rats, les modèles d'infection et la persistance des leptospires dans l'environnement, un mécanisme de persistance des leptospires dans les populations de rats a été décrit. Au préalable un modèle de dynamique des populations de rats a été construit afin de prendre en compte l'effet particulier des environnements urbains et ruraux dans un pays tempéré comme la France. Le modèle final permettrait de tester l'effet de paramètres environnementaux (rural vs urbain) comme facteurs déterminant de l'exposition par les leptospires. Notre propos étant d'ouvrir la voie à l'évaluation préalable de schéma de surveillance afin d'optimiser sur le plan logistique et financier, les meilleures stratégies de surveillance.

- Analyser les données de diagnostic de routine de la leptospirose chez des animaux domestiques en France, afin de décrire et analyser la distribution spatiale et temporelle

À partir des confirmations de suspicions cliniques de leptospirose chez les animaux domestiques, enregistrées au Laboratoire des Leptospires – Lyon (en France entre 2008 et 2012), (1) la distribution des sérogroupes de leptospires impliqués dans des cas de leptospiroses canines et bovines a été déterminée; (2) un indicateur de l'incidence de la leptospirose canine et sa distribution spatiale et temporelle ont été analysées; (3) chez les chiens, les bovins et les porcs, un ratio d'incidence standardisé a été défini puis estimé selon une approche par des statistiques bayésiennes incluant des données de laboratoire et des données météorologiques et environnementales.

### **Résumé de la partie I:**

Dans l'état actuel des connaissances scientifiques, la population humaine potentiellement exposée aux ZAR est grandissante. Les rats surmulots constituent un réservoir d'agents pathogènes zoonotiques parmi lesquels certains émergents. Les changements généraux du climat et des échanges pourraient être responsables d'une augmentation de la prévalence d'agents de ZAR parmi les populations de rats, d'une augmentation des contacts Homme-rat et potentiellement, du risque de transmission de zoonoses. Toutefois, les travaux écologiques et épidémiologiques que nous avons cités dans ce chapitre, ne nous renseignent que de façon ponctuelle sur la réelle exposition des populations à risques. Bien que les rats soient aujourd'hui un enjeu de santé publique et constituent une menace sanitaire y compris dans les pays tempérés et industrialisés comme la France, la gestion sanitaire de ce risque ne peut se faire sans une surveillance sanitaire permettant une réponse mesurée à la diversité des situations à risque.

La mise en place d'une surveillance sanitaire des agents pathogènes zoonotiques du rat est donc une question d'actualité. A ce jour, aucun dispositif n'est opérationnel de façon spécifique, du moins en France et sa mise en place nécessite des connaissances préalables sur la distribution des ZAR, les déterminants de la prévalence d'infection et les indicateurs de portage des agents de ZAR chez les rats. Parmi ceux-ci, la leptospirose, revêt une importance particulière, en termes de dépendance du réservoir murin, de fréquence de l'exposition et de gravité de la maladie tant chez l'homme que chez l'animal domestique.

Dans ce contexte, les travaux que nous allons présenter dans les chapitres qui suivent, traitent successivement d'une espèce source (*Rattus norvegicus*) et d'espèces cibles (animaux domestiques, potentiellement sentinelles de l'Homme vis-à-vis de la leptospirose) et se sont attachés à:

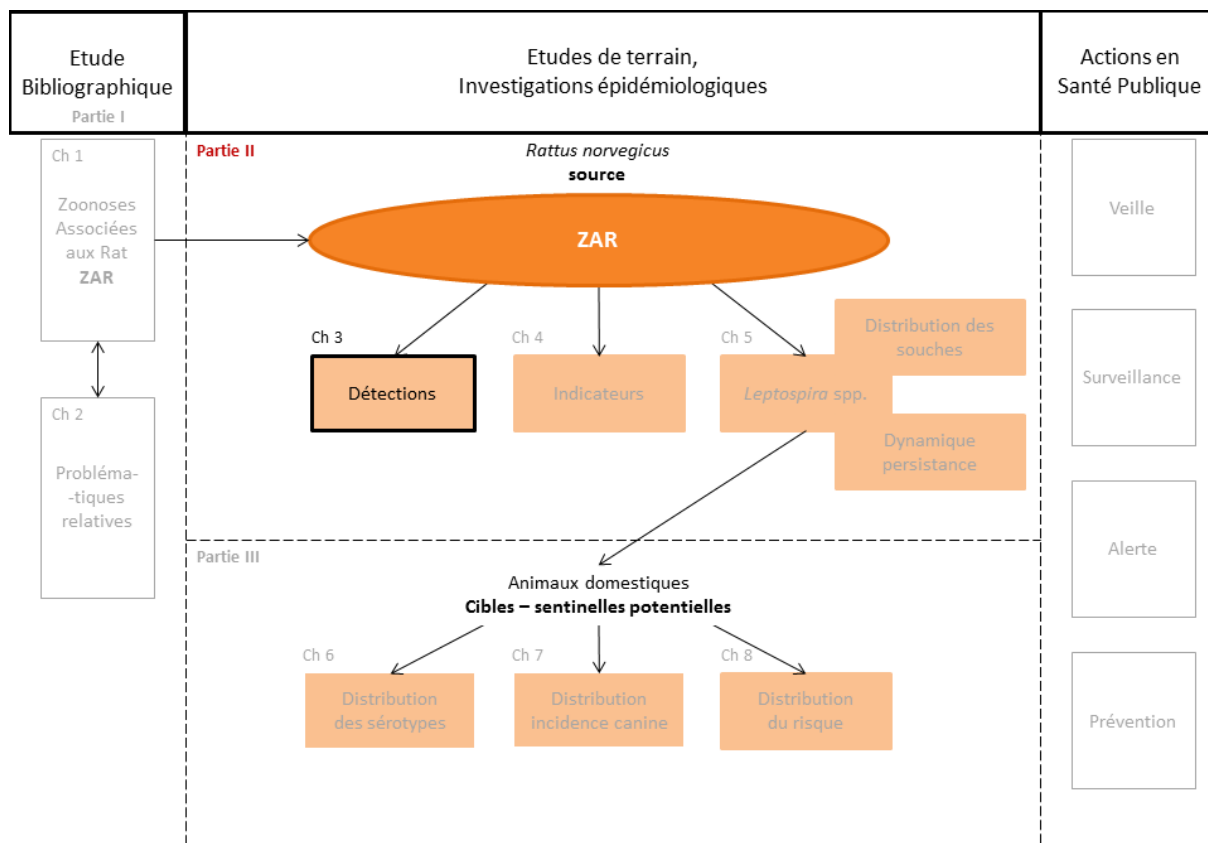
(1) mettre en application des outils de dépistage adaptés à la surveillance de ZAR, (2) identifier la nature des ZAR circulant parmi les rats, en choisissant l'exemple du Rhône en 2011-2012 et décrire leur distribution spatiale, (3) explorer plus particulièrement *L. interrogans*, la distribution des souches et la dynamique de transmission parmi les rats.

À partir des données de diagnostic de la leptospirose chez les animaux domestiques en France, (4) décrire les sérotypes de leptospires circulant chez les chiens et les bovins, (5) décrire et analyser la distribution spatio-temporelle de la leptospirose canine et (6) élaborer un indicateur du risque de leptospirose chez les animaux domestiques et d'exposition de l'Homme.



## PARTIE **II**: ÉTUDES DE TERRAIN

ET INVESTIGATIONS SUR LES ZOONOSES ASSOCIÉES AUX RATS CHEZ  
LA SOURCE -*RATTUS NORVEGICUS*-



# CHAPITRE 3:

## MÉTHODES DE DÉTECTION

### DES AGENTS DE ZOONOSES ASSOCIÉES AUX RATS

De nombreuses méthodes existent pour détecter les micro-organismes cependant rares sont les tests qui permettent de discriminer parfaitement les individus infectés des individus sains. La stratégie de détection doit donc être adaptée à la question épidémiologique posée (*e.g.* étude de la présence, de l'exposition, de la phylogénie des agents). Le présent chapitre s'attache à présenter les méthodes de détection développées simultanément à nos travaux et les résultats de leurs applications sur des échantillons de terrain. L'ensemble des résultats a permis d'ouvrir une discussion sur les stratégies de détection pour la surveillance des ZAR.

- 3.1 Agents pathogènes ciblés
- 3.2 Mode d'échantillonnage de rats dans le Rhône (2011-2012)
- 3.3 Virus de l'hépatite E par PCR
- 3.4 Hantavirus Séoul par séquençage massif
- 3.5 *L. interrogans* par séquençage
- 3.6 Multi-pathogènes par la micro-puce «Rongeurs commensaux»
- 3.7 Comparaison des tests de dépistage

### 3.1. Agents pathogènes ciblés

#### 3.1.1. Sélection des agents pathogènes d'intérêt

Afin de sélectionner les agents pathogènes d'intérêt à étudier, une approche qualitative de l'analyse du risque (*i.e.* la combinaison de la probabilité d'apparition d'un cas et de ses conséquences) a été utilisée. Cette analyse du risque a classé comme prioritaire les agents pathogènes suivants: *Leptospira* spp. (les espèces pathogènes) en tant que problématique majeure en santé publique; le virus Séoul (SEOV) suite à l'apparition récente de cas humains sévères en Europe de l'ouest (Ayrat, 2013a); les virus de l'hépatite E (VHE), les génotypes 1 à 4 et la souche décrite chez le rat, pour le questionnement d'actualité sur le rôle du rat en tant que réservoir pour l'Homme et les porcs; enfin *Toxoplasma gondii* pour améliorer les connaissances sur le rôle du rat dans le cycle de ce parasite d'importance sanitaire (Torgerson et Mastroiacovo, 2013).

#### 3.1.2. Tests de dépistage

La culture bactériologique, la sérologie, la PCR et/ou l'essai biologique (inoculation sur souris) ont été mis en place pour 4 agents: VHE, SEOV, *Leptospira* spp. et *T. gondii*. Parallèlement, 18 agents potentiellement zoonotiques (Tableau 6) ont été recherchés à l'aide d'une micro-puce (<http://www.wildtechproject.com>) et à partir de prélèvements identiques à ceux ayant permis les tests précédents. Cette micro-puce permet la détection de la plupart des agents zoonotiques connus chez le rat (17 sur les 25 décrits dans le chapitre 1) simultanément. Elle représente, de ce fait, un avantage considérable en regard des méthodes conventionnelles qui vise la détection d'un seul agent par analyse. Toutefois, les méthodes conventionnelles, ont l'avantage d'être standardisées et leur capacité à détecter la présence ou l'absence des micro-organismes est largement documentée. Ces tests ne sont pas parfaits pour autant cependant, ils servent de référence dans ces travaux et leurs résultats pourront être comparés à ceux de la micro-puce.

**Tableau 6 – Agents pathogènes dont la présence a été recherchée chez des rats surmulots du Rhône**

Bactéries	Parasites	Virus
<b><i>Bartonella spp</i><sup>a</sup></b>	<b><i>Angiostrongilus cantonensis</i></b>	<b>Cowpox virus<sup>a</sup></b>
<i>Borrelia spp</i>	<b><i>Capillaria spp</i></b>	Choriomeningitis virus <sup>a</sup>
<b><i>Campylobacter spp</i><sup>a</sup></b>	<b><i>Cryptosporidium spp</i></b>	<b>Hantavirus seoul<sup>a,b</sup></b>
<b><i>Escherichia coli</i><sup>a</sup></b>	<b><i>Hymenolepis spp</i></b>	Virus de l'hépatite E génotypes 1-4* <sup>a</sup>
<i>Francisella tularensis</i> <sup>a</sup>	<b><i>Rodentolepis spp</i></b>	<b>Virus de l'hépatite E spécifique du rat<sup>b</sup></b>
<b><i>Leptospira spp</i><sup>a,b</sup></b>	<b><i>Toxoplasma spp</i><sup>a,b</sup></b>	
<i>Listeria spp</i>	<b><i>Trichinella spp</i><sup>b</sup></b>	
<i>Mycobacteria</i> <sup>a</sup>		
<b>MRSA<sup>a</sup></b>		
<b><i>Rickettsia typhi</i><sup>a</sup></b>		
<b><i>Salmonella spp</i><sup>a</sup></b>		
<b><i>Streptobacillus moniliformis</i><sup>a</sup></b>		
<b><i>Yersinia enterocolitica</i><sup>a</sup></b>		
<b><i>Yersinia pestis</i><sup>a</sup></b>		
<b><i>Yersinia pseudotuberculosis</i><sup>a</sup></b>		
<b><i>Spirillum morsus muris</i></b>		

Les agents décrits chez *Rattus norvegicus* sont indiqués en gras (SARM: *Staphylococcus aureus* multi-résistant), les autres étant décrits chez d'autres rongeurs.

La méthode de détection des agents est indiquée comme suit, la µ-puce « Rongeurs commensaux »<sup>(a)</sup> et les méthodes conventionnelles telles que la PCR, la sérologie et la culture <sup>(b)</sup>.

Note: L'ensemble des tests de dépistage et du matériel biologique utilisés ainsi que la localisation des laboratoires partenaires sont synthétisés dans la Tableau 7.

Au-delà de la détection, le recours aux techniques de séquençage pour *L. interrogans* et SEOV a permis une épidémiosurveillance plus fine de ces agents. Dans le contexte d'apparition d'un cas humain de FHSR en France, caractériser les génomes de SEOV murins permettait de documenter la phylogénie et de les mettre en perspectives avec le virus isolé chez l'Homme.



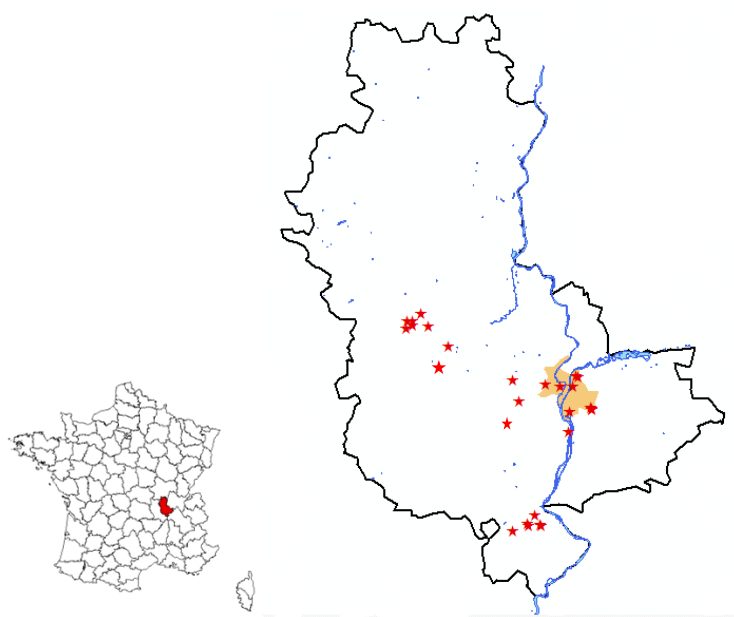
**Tableau 7 – Méthodes conventionnelles  
et laboratoires partenaires**

Agents pathogènes	Organes	Méthodes	Laboratoire
<i>Leptospira interrogans</i>	Reins/urine	Culture/PCR	Laboratoire des Leptospires - Lyon
	Sang/sérum	MAT	
Hantavirus Séoul	Poumons	PCR	Université de Liverpool - RU
virus de l'hépatite E	Foie - fèces	PCR	SVA - Suède
<i>Toxoplasma gondii</i>	sang-cœur	MAT	Laboratoire de parasitologie - Reims
		inoculation sur souris	
Multi - pathogènes	Poumon-foie- rein	Micro-puce à ADN	Université de Nottingham

### 3.2. Mode d'échantillonnage de rats dans le Rhône (2011-2012)

#### 3.2.1. Captures

Un échantillonnage de rats a été fait sur deux périodes de 7 mois (septembre 2010 - mars 2011; septembre 2011 - mars 2012), au cours duquel 178 rats ont été capturés. Vingt-trois (23) sites de capture ont été utilisés et choisis selon un gradient d'urbanisation (Figure 8). Les sites ruraux étaient caractérisés par des fermes (*cf.* Annexe 9) alors que les sites urbains étaient des lieux publics (*e.g.* parc, usine d'incinération, école) et privés (local technique d'immeubles, espaces verts à proximité d'habitation) (*cf.* Annexe 10 – illustration des sites). Les rats ont été capturés vivants pour la plupart (*cf.* Annexe 11 – illustration des pièges), puis anesthésiés, euthanasiés et disséqués aseptiquement pour prélever les organes appropriés aux différents tests (*cf.* Annexe 12 – illustration des étapes de traitement des rats). Les rats morts lors de la capture étaient traités dans les 24 heures post-mortem ou conservé à -20°C jusqu'au moment de la dissection.



**Figure 8 – Distribution des sites de captures dans le Rhône**  
(cf. coordonnées géographiques en annexe 8)

### 3.2.2. Prélèvements

- Afin de détecter des toxoplasmes, les échantillons de cœur étaient incorporés dans une solution antibiotique avec  $1.2 \times 10^{-5}$  g/mL d'amoxicilline (Amoxicilline Panpharma, Luitré, France), 120 UI/mL de pénicilline et 120  $\mu$ g/mL de streptomycine (Pen-Strep Liq 10000, Gibco, Grand Island, NY, USA). Ils étaient ensuite transmis au laboratoire de parasitologie du CHU de Reims dans un délai de 24 heures afin d'éviter toute contamination qui compromettrait la survie d'éventuels Toxoplasmes. Cette précaution était nécessaire pour appliquer la technique de référence d'inoculation sur souris. L'exposition des rats à *T. gondii* a été évaluée par la technique sérologique de micro-agglutination à partir de sang sur buvard, stocké à 4°C avant envoi.
- Afin de détecter la leptospirose, les reins et l'urine, si disponible, étaient transmis immédiatement au Laboratoire des leptospires afin d'assurer des conditions adéquates pour la mise en culture bactérienne. Les analyses moléculaires étaient ensuite effectuées sur l'échantillon frais ou après sa conservation à -20°C. Le sang prélevé par ponction cardiaque était conservé à -20°C en attente du test de micro-agglutination.

- Les échantillons (rein, foie et poumon) analysés par la micro-puce WildTech étaient conservés dans 2mL de RNA later puis stockés à -80°C en attendant leur envoi à l'Université de Nottingham.
- Les échantillons de foie et de fèces étaient stockés à -80°C en attendant leur envoi à l'Institut National Vétérinaire de Suède pour la détection de VHE par PCR.
- Les échantillons de poumon ont été stockés à -80°C en attendant leur envoi à l'Université de Liverpool pour la détection d'Hantavirus Séoul par PCR. Des échantillons de poumon ont parallèlement été analysés par VetAgro Sup avec la méthode du séquençage massif pour la caractérisation de SEOV.

La méthodologie développée pour la détection et l'étude du VHE, SEOV et *L. interrogans* sur les rats de cette étude a été préalablement décrite et publiée (Dupinay *et al.*, 2014; Widén *et al.*, 2014; Zilber *et al.*, 2014). La méthode de détections multi-pathogènes par micro-puce à ADN a été développée à l'Université de Nottingham dans le cadre de la thèse de 3<sup>ème</sup> cycle de Timothy Giles et financé par le Projet WildTech. Dans la suite de ce chapitre, les méthodes de détection et les résultats obtenus sont successivement décrits.

### 3.3. Virus de l'hépatite E par PCR

Bien que le porc soit décrit comme le réservoir principal (Meng, 2011), les dernières découvertes ouvrent la question du rat comme potentiel réservoir du virus de l'hépatite E (VHE). Le portage de VHE par le rat semble répandu, en attestent les nombreuses études sur différents continents (Favorov *et al.*, 2000; Johne *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013a; Purcell *et al.*, 2011). Cependant, les souches caractérisées chez le rat ne semblent pas transmissibles aux primates non humains et inversement, celles de l'Homme ne semblent pas transmissibles au rat (Purcell *et al.*, 2011). Dernièrement, une étude isolant une souche zoonotique chez le rat (Lack *et al.*, 2012) et une autre mettant en évidence la propagation du virus associé au rat dans certaines lignées cellulaires humaines soulèvent à nouveau la question de la place du rat en tant que réservoir du virus de l'Hépatite E pour l'Homme et, éventuellement le porc (Jirintai *et al.*, 2014).

L'ARN viral peut être détecté par PCR quantitative dans le sang et dans les fèces avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité chez l'Homme (Cooper *et al.*, 2005). Il peut être détecté jusqu'à 3 mois après le début de l'infection dans les fèces vs 30 jours dans le sang, par conséquent la PCR à partir de fèces est une alternative intéressante pour la détection de VHE (Bihl et Negro, 2010). La méthode a été adaptée pour la détection du VHE sur le foie et les fèces de rats capturés dans le Rhône et publiée. L'article est résumé dans l'encadré ci-dessous et intégralement rapporté en Annexe 5.

**PCR detection and analyzis of potentially zoonotic Hepatitis E virus  
in French rats**

Virology Journal 2014, 11:90

Widén F, Ayrat F, Artois M, Olofson AS, Lin J.

**Résumé** – Le virus de l'Hépatite E a été détecté chez de nombreuses espèces. Les génotypes 1 et 2 du virus n'infectent que les Hommes alors que les génotypes 3 et 4 sont transmissibles de l'animal à l'Homme et sont responsables de maladies humaines. Les porcs et potentiellement les rats peuvent être réservoir de ces virus. Afin de développer une prévention plus efficace de la transmission à l'Homme, il est important de déterminer de rôle du rat dans l'épidémiologie du VHE. Alors que ne nombreux pays ont rapporté la circulation de VHE, aucune investigation n'a été menée jusque-là, en France. Le portage éventuel de VHE, leur type et leur lien avec les souches préalablement décrites ont été investigués chez des rats sauvages en France.

Quatre-vingt-un (81) rats surmulots ont été capturés, euthanasiés, échantillonnés (foie et fèces) et analysés par PCR en temps réel. L'une était spécifique du virus murin alors que l'autre était spécifique des génotypes 1 à 4 rapportés chez l'Homme.

Parmi les 81 rats testés, douze (12) échantillons de foie et onze (11) échantillons de fèces avaient un résultat positif par la PCR amplifiant le virus murin. Les résultats des analyses PCR détectant les génotypes 1 à 4 étaient négatifs. La proximité génique entre le virus détecté et celui précédemment décrit chez le rat était de 87%.

Cette étude montre pour la première fois le portage de VHE murins chez des rats sauvages en France. Ce résultat permet de documenter la circulation de VHE chez le rat et l'absence de mise en évidence de souche zoonotique. Elle souligne par ailleurs, la pertinence d'investiguer la présence de VHE à partir des fèces et son intérêt pour la surveillance de l'infection chez les rats.

### 3.4. Hantavirus Séoul par séquençage massif

Le séquençage massif (i.e. « Next Generation Sequencing », NGS) permet l'obtention de grandes quantités de séquences en peu de temps et sans phase de clonage, et/ou de travailler sur un grand nombre d'échantillons. Il repose sur deux grandes étapes: préparation des échantillons/amplification et séquençage au sens strict. L'ensemble des segments ainsi analysés sont assemblés pour fournir de larges séquences de génome: génome entier ou étude de multiples échantillons à séquences plus courtes. Les séquences atteignent 700MB/run à 600 GB/run selon les technologies (Radford *et al.*, 2012).

Parmi ces techniques NGS, trois technologies sont apparues simultanément (2007) et leur fonctionnement repose sur deux grandes étapes: La première consiste en la préparation et l'amplification des molécules d'ADN et la seconde comprend la lecture de la séquence proprement dite. (1) La technologie Roche (454) GS-FLX® est basée sur l'amplification de l'ADN par PCR en émulsion et sur un séquençage par pyroséquençage, la lecture de chaque base incorporée est révélée à l'aide d'une réaction chemoluminescente. (2) Les technologies développées par Illumina® sont basées sur l'amplification par cluster et séquençage par synthèse. Une lecture laser permet alors de détecter simultanément tous les acides nucléiques incorporés après clivage du fluorophore. (3) Le système SOLiD® développé par Applied Biosystems comprend une amplification par PCR en émulsion et un séquençage par ligation (système complexe de cycles de ligation et de clivage).

La limite majeure de ces méthodes est leur coût élevé et la nécessité d'un équipement peu accessible pour la plupart des laboratoires. Elles requièrent un personnel spécifiquement formé, notamment des bio-informaticiens capables d'analyser des quantités de données importantes. A partir des échantillons de rats collectés dans le cadre des travaux de thèse, la détection d'Hantavirus Séoul a été faite par séquençage massif. La méthode utilisée et les résultats de son application sur des échantillons de rat sont décrites par Dupinay (*et al.*, 2014) (*cf.* Annexe 6) et résumés dans l'encadré ci-après.

**Detection and genetic characterization of Seoul Virus  
from commensal brown rats in France**

Virol J. 2014 Feb 20;11:32. doi: 10.1186/1743-422X-11-32.

Dupinay T, Pounder KC, Ayrat F, Laaberki MH, Marston DA, Lacôte S, Rey C,  
Barbet F, Voller K, Nazaret N, Artois M, Marianneau P, Lachuer J,  
Fooks AR, Pépin M, Legras-Lachuer C, McElhinney LM.

**Résumé** – Les hantavirus sont des virus à ARN simple brin, principalement transmis à l’Homme par inhalation d’aérosols issus d’urine ou de fèces de rongeurs infectés. Bien que l’infection chez les rongeurs soit asymptomatique, chez l’Homme elle peut être associées à des manifestations cliniques telles que la fièvre hémorragique avec syndrome rénal et le syndrome cardio-pulmonaire dont la sévérité est variable. L’incidence de l’infection par l’hantavirus Séoul chez l’Homme et chez les rongeurs en Europe est considérée comme peu significative. L’infection serait potentiellement introduite de manière sporadique via les ports.

Entre Octobre 2010 et mars 2012, 128 rats surmulots ont été capturés dans le Rhône y compris dans la ville de Lyon, France. Le tissu pulmonaire a été analysé par PCR-niché pour détecter la présence d’ARN d’hantavirus. L’ARN viral directement issu de poumon infecté a été enrichi puis séquencé par une technologie de séquençage massif (Roche 454®).

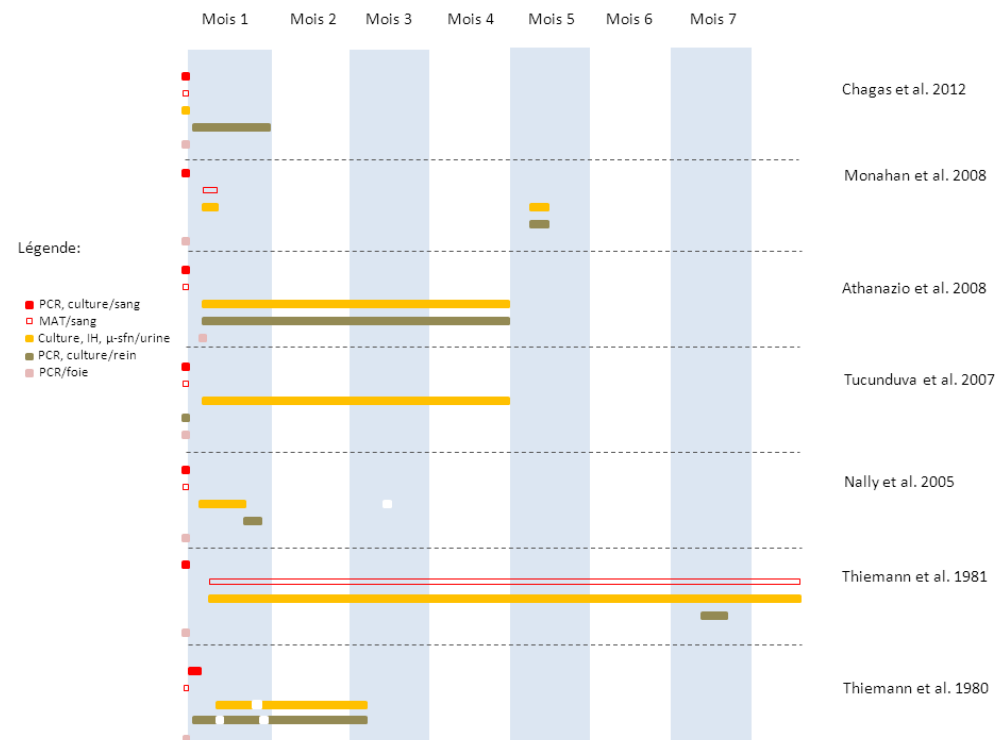
Parmi les 128 rats surmulots, 14% (CI<sub>95%</sub>=18%-20%) avaient un résultat PCR positif. La séquence obtenue et l’analyse phylogénétique suggère l’inclusion du virus parmi la lignée 7 regroupant les virus issus d’Asie du sud-est et les virus précédemment décrits en Belgique et en France. La proximité génétique du virus récemment détecté chez une femme en France (Replonges) était plus importante avec un virus provenant d’un rat capturé au Parc de la Tête d’or – Lyon.

La détection de plusieurs rats infectés par SEOV dans le Rhône, mise en perspective avec la détection de SEOV chez des rats sauvages du Royaume-Uni suggère que ce virus circule chez les rats en Europe. L’absence de spécificité des manifestations cliniques et la difficulté d’identification des hantavirus lors de FHSR pourraient sous-estimer l’actuel l’impact du virus sur la santé publique en Europe.

### 3.5. *L. interrogans* par séquençage

Les méthodes de séquençage développées chez le rat se basent sur les produits de la PCR. Pour détecter les leptospires par PCR, de nombreuses amorces sont disponibles. Par exemple, l'amorce *rpoB* permet de détecter les leptospires pathogènes et saprophytes alors que l'amorce *gyrB* est spécifique des leptospires pathogènes (La Scola *et al.*, 2006; Slack *et al.*, 2006). L'interprétation des résultats dépend donc de l'amorce utilisée. En outre, l'interprétation dépend de la nature et de la qualité des échantillons collectés. Une connaissance de la dynamique de l'infection permet d'appliquer les tests sur les organes ou fluides biologiques infectés. D'après la Figure 9, le rein et l'urine sont les matériaux biologiques où la probabilité de détection des leptospires est la plus grande à l'exception des premiers jours post-infection. L'excrétion intermittente dans l'urine et, lors d'analyse du tissu rénal, l'échantillonnage d'une zone non colonisée par les leptospires pourraient être responsables de faux négatifs. Ainsi, tester une combinaison d'échantillons biologiques permet d'augmenter la sensibilité de la détection. Enfin, la mauvaise conservation des échantillons et l'altération post mortem des tissus favorisent l'apparition d'inhibiteurs de la PCR (Alaeddini, 2012). Lors d'investigations épidémiologiques, la qualité de la collecte et de la conservation conditionne la fiabilité des tests. En conséquence, une attention particulière a été portée aux conditions de collecte (*e.g.* les captures d'animaux vivants étaient privilégiées) et de conservation (*e.g.* échantillons frais ou congelés).

Alors que la PCR permet l'amplification de portion de génome, les approches de séquençage caractérisent précisément des portions plus ou moins grandes de génome amplifiées voire le génome entier. Le séquençage apporte donc un niveau de preuve supplémentaire pour l'identification de l'agent et éventuellement pour déterminer la source d'une maladie. De précédentes études épidémiologiques sur l'infection des rats par les leptospires se sont basées sur des méthodes de séquençage telle que l'analyse de «variable number tandem repeats» (VNTR) (Cosson *et al.*, 2014). Les régions de génome séquencées ont un pouvoir discriminant relatif. Ils permettent au mieux de discriminer l'espèce, le sérotype et parfois le sérovar. Le «multispacer sequence typing» (MST) a été développée en parallèle de nos travaux pour discriminer les isolats de *Leptospira interrogans* (Zilber *et al.*, 2014). La méthode, publiée est intégralement rapportée en Annexe 7 et résumée dans l'encadré ci-après.



**Figure 9 – Dynamique d'infection de *L.interrogans* chez le rat surmulot**  
 culture bactériologique; «Polymerase Chain Reaction», PCR; «Micro Agglutination Test», MAT;  
 immunohistochimie, IH; microscopie sur fond noir,  $\mu$ -sfn



**High-resolution typing of *Leptospira interrogans* strains  
by multispacer sequence typing.**

J Clin Microbiol. 2014 Feb;52(2):564-71.

Zilber AL, Picardeau M, Ayrat F, Artois M, Demont P, Kodjo A, Djelouadji Z.

**Résumé** – La leptospirose est une zoonose de répartition mondiale. L'épidémiosurveillance est importante pour la mise en place de mesures de prévention et de maîtrise de la maladie. Bien que la performance des méthodes de séquençage ait progressé, l'identification de génovars reste incertaine. Nous avons investigué la méthode « multispacer sequence typing » (MST) pour séquencer les isolats appartenant à l'espèce *Leptospira interrogans*, agent principal de la maladie dans le monde. Contrairement à la méthode « variable-number tandem-repeat » (VNTR) qui cible des gènes de ménage, la MST cible les régions intergéniques a priori plus variables et permettrait une meilleure discrimination des isolats.

Au total 33 échantillons d'ADN issus d'isolat de référence de *L. interrogans* et de rats capturés dans le Rhône, ont été analysés avec deux méthodes de séquençage, la VNTR et la MST. Une base de données MST a été conçue à partir de l'ADN des souches de référence pour déterminer les profils MST. Les profils MST était concordant avec les résultats de VNTR. De plus, les analyses MST ont permis de discriminer les génovars voire les souches appartenant à *L. interrogans* génovar Icterohaemorrhagiae. Ces résultats suggèrent que la méthode MST permet une meilleure discrimination des isolats que la VNTR pour ces sérogroupes (Hunter-Gaston index of 0.94 versus 0.68). Chez les rats du Rhône, trois (3) profils distincts ont été identifiés chez des individus issus de sites différents.

La MST permet l'obtention de résultats simples et robustes basés sur des séquences nucléotidiques. La MST identifie des isolats cliniques en lien avec les souches de référence et ainsi permet l'épidémiosurveillance des souches *L. interrogans* circulant chez les rats.

### 3.6. Multi-pathogènes par la micro-puce «Rongeurs commensaux»

La méthode de détections multi-pathogènes par la micro-puce à ADN a été développée à l'Université de Nottingham dans le cadre de la thèse de 3<sup>ème</sup> cycle de Timothy Giles et financé par le Projet WildTech. L'objectif de ses travaux était de concevoir et de développer un outil diagnostique afin de détecter un panel de agents zoonotiques rapportés chez les rongeurs commensaux (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* et *Mus musculus*). La conception et l'évaluation de cet outil, la micro-puce à ADN, étaient le sujet principal des travaux. La finalité était de fournir un outil adapté aux besoins de la surveillance des infections chez les rongeurs commensaux.

L'Union Européenne a financé de nouvelles technologies dans le but de la surveillance des agents zoonotiques émergents et ré-émergents dans la faune sauvage (<http://www.wildtechproject.com>). Des micro-puces ont été développées pour la surveillance des infections présentes ainsi que pour la vigilance vis-à-vis d'agents exotiques. Elles sont adaptées à une utilisation à grande échelle et peuvent potentiellement être adaptées à la détection d'agents pathogènes émergents (Cannon *et al.*, 2010).

L'application de la micro-puce «Rongeurs commensaux» à des échantillons de terrain dont les échantillons issus des rats du Rhône est rapportée dans la thèse de Timothy Giles (Giles, 2014) et fera l'objet d'une publication ultérieure. Le résumé de ces travaux est inclus dans l'encadré ci-dessous. Une analyse plus approfondie des résultats obtenus par la puce est ensuite développée (*cf.* §3.7) afin de déterminer sa pertinence pour l'épidémiosurveillance.

**Development of a DNA-Based Microarray  
for the Detection of Zoonotic Pathogens in Rodent Species**

article en préparation

Giles T, Ayral F, Artois M, Yon L, Abu-Backr Median B

**Résumé** – Parmi les puces développées dans le cadre du projet WildTech, la puce «rongeurs commensaux» (i.e *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* et *Mus musculus*) a été conçue pour détecter 22 agents zoonotiques simultanément dont 3 étaient des formes génériques d'agents pathogènes. Par exemple, la puce incluait les amorces de détection d'hantavirus spp, SEOV et PUUV. Parmi les 20 agents, 17 ont été décrits chez le rat (*Rattus* spp.) et 5 (*Borrelia* spp., *Mycobacterium* spp., *Francisella tularensis*, le virus de la choriomeningite lymphocytaire et l'hantavirus Puumala) sont communément décrits chez d'autres rongeurs.

Des amorces de 60 nucléotides ont été conçues pour obtenir un compromis satisfaisant entre la sensibilité et la spécificité de la détection. La détection de chaque agent était basée sur une à cinq paires d'amorces visant une à cinq régions génomiques. Par exemple, la détection de *Leptospira* était basée sur la détection de la région «Haemolysin», ciblée par deux amorces, Lept/hemo/3184769/F et Lept/hemo/3185246/R. La dynamique d'infection étant propre à chaque agent, le matériel biologique sur lequel est appliqué la puce était cohérent avec le tropisme des agents pathogènes. En l'occurrence, un broyat à partir de 2 à 3 lobes de poumon (au total 5 mg), de 2 à 3 lobes de foie (au total 5 mg) et de ¼ de rein incluant le cortex et la médulla a été utilisé. Dans un but de valider la méthode, tous les résultats positifs ont été vérifiés par des méthodes moléculaires conventionnelles. Concernant *L. interrogans*, les résultats de la micro-puce ont été vérifiés par PCR (amorce *gyrB*) puis séquençage.

A partir d'échantillons de 84 rats urbains, l'utilisation de la micro-puce à ADN a permis de détecter la présence de *L. interrogans* (n=21), de SEOV (n=2), de virus de la choriomeningite lymphocytaire (n=1), de *T. gondii* (n=2) et de *Yersinia* (n=3). A l'issue des vérifications, seuls les 21 cas de *L. interrogans* et les 2 cas de SEOV ont été confirmés.

Malgré certains faux positifs, les résultats de validation et de dépistage par la micro-puce sont prometteurs quant à l'intérêt de cette méthode pour le dépistage de masse dans le contexte de la surveillance des infections chez le rat surmulot.

### 3.7. Identification d'agents zoonotiques, et comparaison des méthodes sur des échantillons de rats sauvages

Dans cette sous partie nous relatons les résultats d'analyse d'échantillons de rats capturés dans divers lieux du département du Rhône. Plusieurs tests, conventionnels (par ex. PCR, sérologie) et micro-puces ont pu être réalisés sur des prélèvements identiques permettant de comparer les résultats de dépistage des agents zoonotiques dans les conditions d'un programme de surveillance.

#### 3.6.1. Résultats associés aux tests conventionnels

D'après les résultats des analyses conventionnelles, les rats étaient principalement porteurs et potentiellement excréteurs de *L. interrogans* (26%, CI<sub>95%</sub>=20%-33%), SEOV (14%, CI<sub>95%</sub>=8%-20%) et VHE spécifique du rat (14%, CI<sub>95%</sub>=8%-20%). Huit pourcent (8%, CI<sub>95%</sub>=2%-14%) avaient un titre  $\geq 1:6$  des rats signifiant une exposition récente ou courante à *T. gondii* (Richomme *et al.*, 2010). Parmi 77 cœurs, 58 ont été testés par inoculation sur souris. Vingt-quatre tests étaient ininterprétables suite à la mort des souris après 24 heures et le parasite n'a pas été isolé à partir des 34 autres tests (Tableau 8).

**Tableau 8 – Détection des agents par les méthodes conventionnelles**  
résultats issus de Ayrat *et al.* 2014.

	<i>L. interrogans</i> (n=171)		SEOV (n=127) <sup>a</sup>	HEV (n=142) <sup>b</sup>		<i>T. gondii</i> (n=78)	
Pourcentage de résultats positif	26% (n=45/171)		14% (n=18/127)	14% (n=20/142)		8% (n=6/78)	
IC 95%	20% – 33%		8% – 20%	8% – 20%		2% – 14%	
Tests	PCR-TR	Culture	PCR nichée	PCR-TR	PCR-TR	MAT	inoculation sur souris
Matériel	Rein/urine	Rein	poumon	foie	Fèces	buvard	cœur
Nb positif	44	22	18	18	12	6	0

PCR-TR: Polymérase de réaction en chaîne en temps réel.

### 3.6.2. Résultats associés à la micro-puce

A partir d'échantillons de 84 rats urbains, l'utilisation de la micro-puce à ADN au sein de l'Université de Nottingham (par Dr Timothy Giles) a permis de détecter la présence de *L. interrogans* (n=21), de SEOV (n=2), de virus de la chorio-méningite lymphocytaire (n=1), de *T. gondii* (n=2) et de *Yersinia* (n=3). A l'issue des vérifications, seuls les 21 cas de *L. interrogans* et les 2 cas de SEOV ont été confirmés (Tableau 9).

**Tableau 9 – Agents détectés par la  $\mu$ -puce «rongeurs commensaux»**  
à partir de 84 spécimens (mix poumon-rate-foie) issus de rats urbains du Rhône.

Bactéries	Détection (n=84)	Virus	Détection (n=84)	Parasite	Détection (n=84)
<i>E. coli</i>	0	Cowpox	0	<i>Toxoplasma</i>	0
<i>Bartonella</i>	0	Hantavirus spp	0		
<i>Campylobacter</i>	0		SEOV	2	
<i>Francisella</i>	0		PUUV	0	
<i>Leptospira</i>	21	HEV	0		
Multiple Resistancy <i>Staphylococcus aureus</i>	0	LCMV	0		
<i>Mycobacteria spp</i>	0				
<i>Rickettsia typhi</i>	0				
<i>Salmonella</i>	0				
<i>S.typhimurium</i>	0				
<i>Streptococcus monilliformis</i>	0				
<i>Yersinia spp</i>	0				
<i>Y.enterocolitica</i>	0				
<i>Y.pestis</i>	0				
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	0				

### 3.6.3. Évaluation de la concordance des tests

Nous n'avons pu comparer les résultats de dépistage que sur deux exemples d'agents pathogènes, respectivement les leptospires et le virus Séoul, qui sont présentés ci-dessous.

### 3.7.3.1. *L. interrogans*

Dans le cas des infections et de l'exposition à *L. interrogans*, la distribution des résultats a été détaillée selon l'analyse et, l'organe ou le fluide biologique utilisés (Tableau 10).

**Tableau 10 - Distribution des résultats positifs pour *L. interrogans***  
selon le test (i.e. PCR, culture) l'analyse et l'organe

Sites	No rats capturés	No mix micro-puce- positifs	No reins PCR-positifs	No urine PCR-positive (no d'éch testés)	No reins culture- positives	No Echan MAT- positifs	Total rats infectés (ou exposés)
Francheville	9	0	1		1		1
Guillotière	3	2	2		0		2
la chapelle	1	0	0		1		1
Mermoz_B	13	5	9	2 (3)	9	4 (9)	9 (10)
Mermoz_F	17	3	12		6	1 (2)	13
Mermoz_R	7	2	2	1(2)	2		3
PTO	8	4	5	1(1)	3	4 (4)	5 (6)
PTO (2)	3		2		2		2
UIOM	23	5	2	0(1)	0	0 (16)	6
Total	84	21	36	4(7)	24	9 (31)	42 (44)

PTO (2) : échantillonnage de convenance suite à une campagne de capture de décembre - janvier 2013

### Comparaison des tests conventionnels

La Tableau 11 met en évidence les discordances observées parmi les tests conventionnels. L'information apportée par le MAT se limite à l'exposition du sujet à la bactérie; utilisé chez l'Homme, ce test à vocation à confirmer une suspicion clinique et à permettre un choix thérapeutique approprié. L'usage de ce test en épidémiologie est donc limité. Deux facteurs sont principalement responsables de fausses réponses négatives, (1) le délai de séroconversion et (2) la réponse immunitaire faible du rat infecté par des leptospires. Parmi les 7 échantillons MAT+/PCR+ ou MAT+/culture+, 5 avait un titre  $\leq 1:60$ . Les titres observés sont faibles et attestent de cette faible séroconversion.

**Tableau 11 – Discordance entre les tests**  
Microscopic Agglutination Test, MAT; Polymerase Chain Reaction, PCR et la culture bactériologique et l'organe testé (urine, u ou rein, r)

	MAT + (n=9)	PCR u + (n=5)	PCR r + (n=33)	Culture + (n=21)
MAT – (n=22)		1	3	2
PCR u – (n=4)	1		0	0
PCR r – (n=48)	7	1		1
Culture – (n=58)	7	1	13	

Bien que l'isolement de la bactérie soit la méthode diagnostique de choix pour la recherche d'une étiologie, elle pâtit de nombreux désavantages lorsqu'elle est utilisée à des fins épidémiologiques. La culture est longue et laborieuse, la bactérie est fragile dans des conditions de conservation inadéquates (*e.g* présence de contaminants). La culture est donc spécifique mais peu sensible. La combinaison de la culture et de la PCR permet d'augmenter la sensibilité de la détection. En effet, la PCR quantitative est la technique la plus sensible chez l'Homme (Bharti *et al.*, 2003). Toutefois, de faux résultats négatifs peuvent être obtenus suite à l'infection par des leptospires pathogènes non recensés (Bourhy *et al.*, 2011) ou à l'agrégation des bactéries dans une zone non prélevée du rein.

### Comparaison puce/PCR: Indice kappa

Dans le but d'évaluer les qualités du prototype de micro-puce Wild Tech, ses résultats de détection ont été comparés à ceux de la PCR en tant que technique la plus sensible. Le Tableau 12 rapporte la distribution des résultats de chaque test.

**Tableau 12 – Concordance des résultats obtenus par la  $\mu$ -puce et la PCR**  
à partir d'échantillons issus de 84 rats.

	PCR +	PCR -	Total
$\mu$ -Puce +	16	5	21
$\mu$ -Puce -	16	47	63
Total	32	52	84

Pour le dépistage de la leptospirose, la concordance qualitative entre les résultats de la micro-puce et de la PCR a été évaluée en utilisant l'indice kappa (Dohoo *et al.*, 2003). Les résultats sont présentés ci-dessous :

concordance observée	0,75
concordance attendue	0,56
concordance au-delà de la chance	0,19
concordance potentielle au-delà de la chance	0,44
<b>Kappa</b>	<b>0,43</b>

Une valeur du kappa entre 0,2 et 0,4 représente une concordance acceptable.

Afin de tester un éventuel biais dans la distribution des résultats positifs (PCR+ et  $\mu$ -puce +), la comparaison des deux proportions ( $p_1 = \frac{PCR_+}{PCR_+ + PCR_-}$ ;  $p_2 = \frac{\mu\text{-puce}_+}{\mu\text{-puce}_+ + \mu\text{-puce}_-}$ ) a été testée. Les données étant paires, un test de McNemar's  $\chi^2$  a été utilisé (Dohoo *et al.*, 2003) et le coefficient déterminé est indiqué ci-dessous :

$$\text{McNemar's } \chi^2 = 5,76$$

Le risque d'erreur associé à l'hypothèse nulle ( $p_1 = p_2$ ) est supérieur à 5%. L'hypothèse nulle est donc rejetée dans ce cas et suggère une discordance importante entre les résultats de la PCR et de la micro-puce. La confiance associée à l'indice kappa obtenu est donc peu satisfaisante.

### 3.7.3.2. Hantavirus Séoul (SEOV)

#### Résultats

La micro-puce a détecté 2 échantillons contenant du SEOV, alors que la PCR en a détecté 14. Le nombre limité de tests ayant donné une réponse positive aux deux tests ne permet pas d'analyser statistiquement leur concordance (Tableau 13).

**Tableau 13 – Hantavirus Séoul par la  $\mu$ -puce et la PCR**  
effectifs des résultats positifs et négatifs  
à partir d'échantillons issus de 84 rats.

	PCR +	PCR -	Total
$\mu$ -Puce +	2	0	2
$\mu$ -Puce -	12	70	82
Total	14	70	84



Seuls deux rats ont été testés positifs parmi les 14 PCR+. Ce résultat suggère un manque de sensibilité analytique de la micro-puce vis-à-vis des SEOV. Toutefois, un test confirmatoire a été effectué sur les pools poumon-foie-rein testé négatif par la micro-puce et aucun n'a permis de mettre en évidence de l'ARN de SEOV.

### **Interprétation des résultats**

*Choix des tests* – Lors d'investigations sur la relation pathogène - hôte, les techniques de détection doivent être adaptées aux particularités immunitaires du rat (*cf.2.2*). Par exemple, les leptospires sont adaptées à leur persistance dans le tissu rénal du rat (Nally *et al.*, 2011) et favoriseraient leur tolérance par le système immunitaire. En conséquence, la quantité d'anticorps circulants dirigés contre les leptospires est faible (Agudelo-Flórez *et al.*, 2009). Le MAT est un test semi quantitatif (Chappel *et al.*, 2004), donc, étudier la prévalence d'exposition par cette technique peut impliquer sa sous-estimation chez le rat. Par ailleurs, le MAT permet potentiellement d'identifier le sérotype infectant, cependant de fréquentes réactions croisées limitent l'interprétation des résultats chez le rat comme chez les autres espèces (Levett, 2003; Smythe *et al.*, 2009). L'utilisation seule du MAT est donc inadaptée aux investigations épidémiologiques (de Faria *et al.*, 2008; Krøjgaard *et al.*, 2009; Villanueva *et al.*, 2010).

La détection de l'exposition à *T.gondii* par le test d'agglutination modifié a une bonne sensibilité et spécificité chez de nombreuses espèces (Dubey, 2010; Dubey et Desmonts, 1987). L'infestation étant le plus souvent permanente, un résultat positif est donc témoin de l'infection. Cette approche est aussi plus sensible que la PCR ou l'inoculation sur souris, tributaire de la distribution du parasite dans le prélèvement tissulaire.

*Dangers sanitaires* – Parmi 18 agents recherchés, la détection de 2 agents zoonotiques (*L.interrogans*, SEOV) et d'un agent potentiellement zoonotique (VHE) chez 178 rats permet d'identifier les dangers sanitaires associés aux rats dans le Rhône. Cette analyse exploratoire identifie *L. interrogans* comme agent prédominant et le principal danger sanitaire dans un contexte de santé publique. L'excrétion importante et la persistance de Leptospires dans l'environnement favorisent l'exposition de l'Homme à la bactérie (Athanzio *et al.*, 2008; Aviat *et al.*, 2009; Monahan *et al.*, 2009a; Nally *et al.*, 2011; Thiermann, 1980, 1981). Dans une moindre mesure mais de façon non négligeable, le SEOV est présent (14%) dans les populations de rats. Aux vues des données épidémiologiques récentes (Jameson *et al.*, 2013b; Macé *et al.*, 2013), le portage de SEOV parmi les rats est un risque avéré de transmission à l'Homme. L'étude n'a pas permis d'identifier de souches zoonotiques du VHE, néanmoins la

persistance à une fréquence importante de souches non virulentes de ce virus doit conduire à étendre les investigations, notamment dans l'environnement des élevages de porcs afin de mieux évaluer la dangerosité de ce portage.

*Outils pour la surveillance* – Un outil de surveillance permettant le suivi du portage de *L. interrogans* et de SEOV parmi les rats ainsi que la vigilance vis-à-vis des autres agents zoonotiques répondrait donc au besoin actuel de la santé publique. La micro-puce apporte potentiellement ces différents critères de surveillance et de vigilance alors que l'utilisation raisonnable (économiquement et logistiquement) des méthodes conventionnelles permettrait la surveillance de *L. interrogans* et SEOV mais la vigilance vis-à-vis d'autres agents zoonotiques serait limitée par leur nombre élevé.

*Concordance des tests* – Nous avons étudié la concordance des résultats de la micro-puce avec ceux d'autres méthodes de détection afin de documenter la pertinence de cette nouvelle technologie dans le cadre de la surveillance. L'outil à la base de la micro-puce est une PCR. Le même outil est donc utilisé dans l'analyse conventionnelle et la micro-puce. Néanmoins, la discordance potentielle entre ces tests pourrait être liée à la spécificité ou à la sensibilité des amorces utilisées. Dans ce dernier cas, le matériel biologique utilisé pourrait être en cause. Un pool de foie, de rein et de poumon est utilisé pour la micro-puce alors que le rein et/ou l'urine sont utilisés pour la PCR conventionnelle. Par conséquent on peut redouter une dilution de la concentration des agents pathogènes, et une moindre détectabilité par rapport à la PCR conventionnelle. Le tropisme des leptospires chez le rat porteur est essentiellement rénal. Le pool contient des quantités de tissu rénal moindre, et la quantité d'ADN bactérien extrait peut être d'autant diminuée voire absente. Malgré la conception d'une micro-puce avec une bonne sensibilité analytique, une charge bactérienne faible pourrait impliquer des faux négatifs. SEOV ayant un tropisme pulmonaire, il est donc ici encore possible que le pool dilue la charge d'ARN viral en-deçà du seuil de détection.

## **Conclusions**

La micro-puce à ADN est une technologie économiquement plus intéressante que les méthodes usuelles dans le contexte de la détection multi-pathogène. Leur développement à grande échelle les rendra d'autant plus abordables. Bien que la technologie soit maintenant dépassée par les méthodes de séquençage massif, le coût élevé de ces dernières méthodes reste une limite à leur utilisation. Il laisse une place certaine au développement des puces à moyen terme (Russell *et al.*, 2009).

### **Résumé chapitre 3:**

Le dépistage de 178 rats surmulots dans le Rhône a permis d'identifier la présence deux dangers zoonotiques majeurs, *L. interrogans* et le virus SEOV présents à 26% (IC<sub>95%</sub>=20%-33%) et 14% (IC<sub>95%</sub>=8%-20%) respectivement. Ces agents constituent une menace pour la santé publique. Leur présence, suspectée par les autorités sanitaires, mais non mesurée dans la pratique, confirme l'intérêt de la mise en place d'une surveillance ciblée des ZAR, afin de documenter le risque d'exposition de l'Homme.

Le virus de l'hépatite E spécifique du rat a été identifié chez 14% (IC<sub>95%</sub>=8%-20%) des individus. Ce virus, non zoonotique, devrait néanmoins être mieux connu compte tenu de sa parenté avec les souches transmissibles à l'homme, en particulier dans l'hypothèse où le rat serait réservoir de souches zoonotiques dans les élevages porcins.

*T. gondii* n'a pas été isolé, cependant l'exposition au parasite a été mise en évidence chez 8% (IC<sub>95%</sub>=2%-14%) des rats, confirmant une circulation du protozoaire entre chat et rats. En tant que proies, les rats porteurs du parasite peuvent infester des félinés, hôtes définitifs et excréteurs de la forme zoonotique. Le suivi sérologique de *T. gondii* chez le rat serait un potentiel indicateur d'infestation du milieu et permettrait de comprendre les facteurs de risque de la persistance de l'infestation des chats et leur propagation aux humains.

Les moyens disponibles pour ce projet, ne nous ont pas permis d'élargir le spectre de ZAR potentiellement dangereux tant en milieu rural qu'en milieu urbain. Toutefois le facteur limitant d'une surveillance n'est probablement pas la mise en œuvre de tests diagnostiques, à fortiori si l'on dispose de puces ADN à large spectre. La faisabilité d'une telle surveillance est donc démontrée par les études préliminaires que nous avons réalisées.

La dynamique des infections chez les rats et la réaction immunitaire modérée vis-à-vis des micro-organismes dont ils sont porteurs, limitent la sensibilité de la détection par les méthodes conventionnelles (*e.g.* culture, histologie, tests immunologiques). Une combinaison de tests directs ou indirects appliqués à divers matériels biologiques pourrait améliorer cette sensibilité. Face aux coûts des tests et aux difficultés logistiques d'échantillonnage, de préservation et de transport des prélèvements, une micro-puce «rongeurs commensaux» s'avère un outil pertinent. Toutefois, les résultats préliminaires suggèrent un manque de sensibilité et de spécificité analytique. Dans ce contexte, les méthodes conventionnelles ou le séquençage massif offre pour le moment plus de possibilité en termes de surveillance mais sont plus chers et moins adaptés à un large échantillonnage.

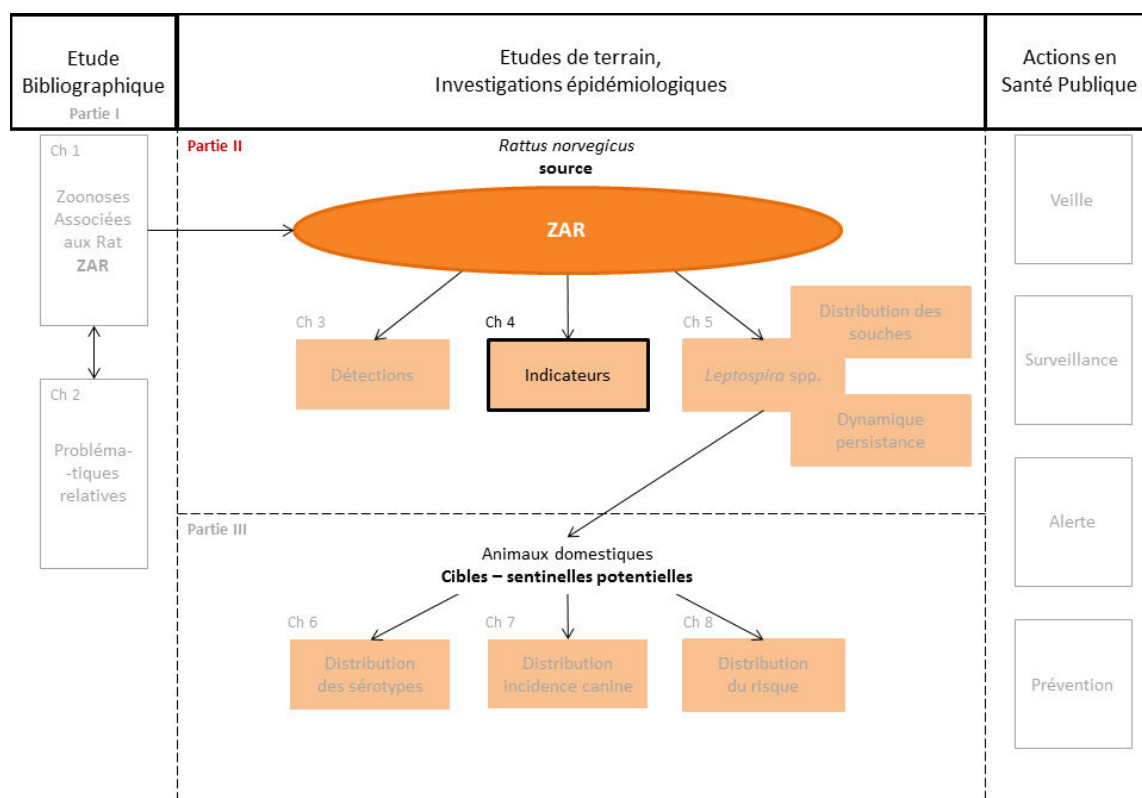
Des investigations supplémentaires pour optimiser la charge microbienne dans le pool de matériel biologique pourraient être menées pour pallier au manque de sensibilité de la micro-puce. La poursuite des études permettra de préciser les avantages et l'employabilité de la micro-puce dans le cadre de la surveillance de *L. interrogans* et SEOV et pour maintenir la vigilance vis-à-vis d'autres agents zoonotiques.

# CHAPITRE 4:

## DISTRIBUTION SPATIALE DU RISQUE DE ZAR

### ET INDICATEURS

La connaissance de la distribution spatiale du risque d'infection zoonotique a un intérêt majeur pour déterminer la pression d'infection qui s'exerce sur les populations exposées. De nombreuses études ont cherché à déterminer les variables environnementales associées à l'infection chez les rats (Aviat *et al.*, 2009; Easterbrook *et al.*, 2007; Koizumi *et al.*, 2009; Krøjgaard *et al.*, 2009) cependant, les limites des études de terrain (multiplicité des conditions, temps d'étude limité, populations murines instables) impliquent des réponses difficiles à transposer. En absence de déterminants connus, il est nécessaire de définir des indicateurs de risque pouvant aiguiller les décideurs de santé publique dans les politiques de prévention de l'exposition des personnes: professionnels ou personnes actives dans les milieux infestés par les rats. Dans ce but, nous avons étudié la distribution spatiale des rats infectés et les zones potentiellement à risque de transmission de ZAR à l'Homme dans, et aux alentours de la ville de Lyon. Le produit de cette étude a fait l'objet d'un article publié et présenté dans ce chapitre (Données supplémentaires en Annexes 13 à 18).



# The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010–2012)

F. AYRAL<sup>1</sup>\*, J. ARTOIS<sup>2</sup>, A.-L. ZILBER<sup>1</sup>, F. WIDÉN<sup>3</sup>, K.C. POUNDER<sup>4</sup>,  
D. AUBERT<sup>5</sup>, D. J. BICOUT<sup>6</sup> AND M. ARTOIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> WildTech, PERS, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France

<sup>2</sup> Université de Rennes 2, Rennes Cedex, France

<sup>3</sup> The National Veterinary Institute (SVA), Department of Virology, Immunobiology and Parasitology, Uppsala, Sweden

<sup>4</sup> Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK

<sup>5</sup> Laboratory of Parasitology, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, National Reference Centre on Toxoplasmosis, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims Cédex, France

<sup>6</sup> Biométrie et Épidémiologie, EPSP-TIMC, UMR CNRS 5525, UFJ, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile

Received 13 December 2013; Final revision 24 March 2014; Accepted 21 April 2014

## SUMMARY

*Leptospira interrogans*, hantaviruses (particularly Seoul virus), hepatitis E virus (HEV), and *Toxoplasma gondii* are rat-associated zoonoses that are responsible for human morbidity and mortality worldwide. This study aimed to describe the infection patterns of these four pathogens in wild rats (*Rattus norvegicus*) across socioeconomic levels in neighbourhoods in Lyon, France. The infection or exposure status was determined using polymerase chain reaction or serology for 178 wild rats captured in 23 locations; additionally, confirmatory culture or mouse inoculation was performed. Multivariate logistic regression analyses were used to investigate whether morphological and socioeconomic data could predict the infection status of the rats. This study revealed that the rat colony's age structure may influence the prevalence of *L. interrogans*, hantavirus, and HEV. In addition, areas with high human population densities and low incomes may be associated with a greater number of infected rats and an increased risk of disease transmission.

**Key words:** Hepatitis E virus, *Leptospira interrogans*, Norway rats, *Toxoplasma gondii*, Seoul virus.

## INTRODUCTION

Wildlife is estimated to be responsible for 72% of emerging infectious diseases in humans [1]. Key among wildlife species, *Rattus norvegicus* is prevalent worldwide and harbours rat-borne zoonoses (RBZs) [2], such as *Leptospira interrogans*, hantaviruses,

hepatitis E virus (HEV), and *Toxoplasma gondii*. These RBZs are responsible for potentially life-threatening human infections and have raised public health concerns in Europe.

Leptospirosis (caused by *L. interrogans sensu lato*), an acute bacterial infection in humans, was recently recognized as an emerging public health problem [3]. *Leptospira* are maintained by a wide range of hosts, and *R. norvegicus* is reportedly the primary carrier [4]. The bacteria are shed in the hosts' urine and can survive for prolonged periods. Occupational

\* Author for correspondence: Dr. F. Ayral, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France.  
(Email: florence.ayral@vetagro-sup.fr)

and recreational exposures to contaminated water bodies in proximity to various host species are commonly reported risk factors. However, cities, particularly environments with poor hygiene, are the primary source of rat-associated leptospirosis [5].

Haemorrhagic fever with renal syndrome is a mild to severe human disease caused by viruses from the genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae* [6]. Each hantavirus species is carried by a specific rodent host species; Seoul virus (SEOV) has been found to be carried by *R. norvegicus* worldwide [2]. Unlike in Asia, few confirmed occurrences were reported in Europe before the recent emergence in the UK and France [7, 8]. Hantavirus is shed in the excreta of infected hosts, and the primary transmission pathways are the inhalation of suspensions of contaminated dust and the passage of infected saliva through bites [9]. Areas with growing rodent populations are at increased risk for human infection [10].

HEV is widespread and causes acute hepatitis in humans. A variety of HEV strains have been identified in Norway rats from Europe without any evidence of zoonotic pathogenicity [11, 12]. However, zoonotic HEV has been reported in the USA [13], confusing the role of rats as a disease reservoir for humans and livestock.

Toxoplasmosis is a highly prevalent parasitic disease worldwide and is caused by the protozoan *T. gondii*. Humans become infected after ingesting food contaminated with *T. gondii* oocysts. Vertical transmission is particularly concerning for humans, as *in utero* infection can cause abortion or congenital defects [14]. Although cats are the only hosts known to excrete the infectious form, the parasite cycle involves most warm-blooded vertebrate species, including Norway rats. As felids' prey, rats are important in the parasite life cycle and in human toxoplasmosis epidemiology.

The Norway rat is a synanthropic species that uses human habitats for shelter and food. Impoverished inner cities have been targeted for RBZ investigations because it is assumed that poor hygiene conditions, infrastructure disrepair, and low health status may lead to contact between rats and humans, and potentially to RBZ transmission [15]. Conditions in impoverished cities may also be related to high numbers of infected and shedder rats, which are responsible for rapidly spreading pathogens in human habitats and increased human exposure. However, no previous studies have investigated whether impoverished inner cities have a higher prevalence of infected rats.

A description of RBZ carriage in Norway rats across socioeconomic indices increases the knowledge of the related health risks. A more complete understanding of zoonotic infection in rats would mitigate their role in spreading zoonotic diseases by increasing awareness among healthcare professionals and supporting the development of appropriate surveillance.

The aims of the present study were (1) to describe the prevalence of the four pathogens in the Lyon region, France, (2) to identify the risk factors for infection in Norway rats, and (3) to define the potential socioeconomic indicators for human exposure in the Lyon region. Thus, trapping was performed on an urbanization gradient in and around Lyon. Multivariate models were built to predict the pathogen carriage status of the rats; morphological and socioeconomic data were used as independent variables.

## METHODS

### Study area

The study area comprised 23 locations in the Rhône department (i.e. administrative spatial unit) of France, which encompasses the city of Lyon and 14 farms within 30 km of our laboratory (45° 47' 30.93' N; 4° 42' 30.28' E). This area contains a range of urbanization levels. Farms were requested to participate based on their inclusion in previous surveys, and all agreed. The dwellings and public areas were selected based on high rat concentrations reported by the Hygiene Service of Lyon.

Most farms were medium to large size (i.e. >100 animals) with mixed livestock. The nine urban trapping locations were distributed in dwelling areas, public gardens, waste disposal areas, and an industrial area in the city centre and suburbs.

### Sampling

The survey was subdivided into 6-month periods: (1) September 2010 to February 2011 and (2) October 2011 to March 2012. To account for possible seasonal variation in the pathogen prevalence, the two periods encompassed the same season. The sampling size ( $n \approx 90$ ) was calculated using a 95% confidence level, a relative accuracy of 50%, and an expected prevalence of 10–30% [16]. To account for possible variation in the pathogen prevalence among different urbanization levels, the same sample size was used

in areas of low and high population density. During the two periods, 178 free-living Norway rats were trapped in areas of low ( $n=94$ ) and high ( $n=84$ ) population density.

Most rats were captured with small ( $28\text{ cm} \times 9\text{ cm} \times 9\text{ cm}$ ) or large ( $50\text{ cm} \times 15\text{ cm} \times 15\text{ cm}$ ) single-catch rat traps. The captured rats were transported to the laboratory and immediately anaesthetized using isoflurane. A blood sample was obtained by cardiac puncture. Subsequently, the rats were sacrificed by cervical dislocation. The rats that succumbed to capture were frozen at  $-20^\circ\text{C}$  and thawed on the day of dissection. Data were recorded on weight, size, sex, sexual maturity (i.e. the presence of seminal vesicles in males and a developed uterus in females) and pregnancy. Lung and liver lobe fragments weighing between 50 and 100 mg were collected, and the kidney was removed. The heart was incorporated in an antibiotic solution with  $1.2 \times 10^{-5}\text{ g/ml}$  amoxicillin (Amoxicilline Panpharma, France), 120 UI/ml penicillin and 120  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin (Pen-Strep Liq 10 000, Gibco, USA). Faecal samples were collected from the rectum, and all tissue and faecal samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  immediately following collection.

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional guides on the care and use of laboratory animals (agreement no. 69-020931).

### Screening protocols

*L. interrogans* colonization of the kidney was assessed via culture [17] and a pathogen-specific *L. interrogans* TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) kit (TaqVet PathoLept kit, LSI, France); additionally, the *rpoB* gene was targeted. Lung tissues were screened for hantavirus using a nested pan-hantavirus reverse transcription (RT)-PCR selective for partial polymerase large segment (L) gene sequences, subsequent molecular typing was performed to determine the hantavirus species as previously described [18]. The HEV viral load in the liver and faeces was analysed using TaqMan real-time PCR reagents specific to rat-strain HEV and genotypes 1–4 [19]. Sera extracted from blood-soaked blotters were tested for *T. gondii* antibodies using a modified agglutination test (MAT) that detects *T. gondii*-specific IgG antibodies [20]. The hearts of animals with a positive agglutination (starting dilution 1:6) were bioassayed in mice to isolate viable *T. gondii* [21].

### Prevalence calculation

*L. interrogans*, SEOV, and HEV were screened based detecting pathogen nucleic acid sequences or the microorganism itself; rats testing positive were considered to be infected and potential shedders of the pathogens. The rats with MAT-positive results were considered to be exposed because the presence of antibodies against the pathogen could result from previous or current contact with the pathogen. The prevalence of infected or exposed rats was defined as the proportion of rats with any positive test results. The apparent prevalence was restricted to the population sampled since and the administrative unit of the Rhône department

### Variables

Two categories of explanatory covariates were considered: rat-related and socioeconomic covariates. Rat survival during the trapping was also considered, as death and freeze–thaw cycles before dissection could alter the sample quality and underestimate the prevalence.

The rat data included the species (determined by external morphology and macroscopic observations), sex, weight, size, and approximate age, based on sexual maturity and pregnancy. A body mass metric was constructed from the residuals that resulted from the regression of weight on size [22]. The capture success, a proxy of the population size, was accurately defined in five sites by

$$\text{capture success} = \frac{n_i}{t_i \times d_i},$$

where  $n_i$  is the number of rats captured,  $t_i$  the number of traps set and  $d_i$  the number of days of trapping at the site  $i$ .

The extent and features of urbanization were characterized using the socioeconomic data. Eleven candidate variables were extracted from the 2009 national census data provided by the Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. Remotely sensed data were obtained at the smallest geographical unit, which is the Ilot Regroupé pour l'Information Statistique (IRIS). Each IRIS contains 2000 inhabitants. The socioeconomic variables are displayed in Table 1.

### Spatial analysis

The location and number of rats in each trapping area that tested positive and negative were mapped using



Table 1. *Description of socioeconomic covariates*

Covariates	Name of covariate	Definition
Human population density	Human population	Population/surface (km) <sup>2</sup>
Median income of the population	Income	Median incomes of the population included in the IRIS
Population growth from 1999 to 2009	Population growth	Population in 2009/population in 1999
Percentage of 20–64 years age group	Population age	20–64 years age group/total population
Percentage of flats	Per cent flat	Number of flats/number of flats + houses
Percentage of small flats	Per cent small flat	Number of 1- and 2-room dwellings/number of dwellings
Ratio of renters and owners	Ratio renter/owner	Number of renters/number of owner of their residency
Ratio of low-income dwellings (LID)	ratio LID	Number of LID rented/number of other rented dwellings
Percentage of ungraduated population	Level of graduation	Population aged >15 years without a diploma/population aged >15 years
Ratio of large and small families	Family size	Family with at least three children/family with two or fewer children
Ratio of unemployment	Rate of unemployment	Number of unemployed people/number of employed people

ArcGIS version 9.3 (ESRI, USA). Spatial clusters of high and low pathogen prevalence were identified using the Getis-Ord  $G_i^*$  statistic. The local sum for features and the feature's neighbours were compared proportionally to the sum of all features. When the local sum was statistically significantly different from the expectation, the region was denoted as having low or high prevalence.

To identify the potential socioeconomic proxies of RBZ, the candidate variables from the census data sets were extracted from the IRIS units with trapping locations. An approach using various boundaries for the quadrats when extracting data was implemented to verify the effects of different spatial scales on the risk factors [23]. The socioeconomic data were extracted using four quadrat sizes: 100 m × 100 m, 200 m × 200 m, 400 m × 400 m, and 800 m × 800 m. The socioeconomic metrics for each quadrat were calculated by weighting the remotely sensed data by the percentage of the IRIS surface that was included in the quadrat. For each spatial level of analysis, a new data set was obtained by spatial query using the software R project version 3.0.1 (R Development Core Team, Austria) and ArcGIS version 9.3 (ESRI, Redland, CA, USA).

### Statistical analysis

To identify the characteristics associated with each pathogen's carriage status, distributions of the explanatory variables were examined within the samples

testing positive and negative.  $\chi^2$  tests and Wilcoxon tests were used, as appropriate, and an alpha level of 0.05 was used to reject the null hypothesis. For each pathogen, the potential effect of the population size on the number of infected rats in the trapping sites was assessed by testing the Pearson correlation between the capture success and the related number of infected rats. An  $\alpha$ -level of 0.05 was used to reject the absence of correlation. The result obtained determined whether the capture success had to be considered in the models.

Statistical modelling was performed to evaluate the use of rat-related criteria and socioeconomic indices as predictors of exposure or infection in rats. All remotely sensed data were transformed to be normally distributed when they were incorporated into the models, and missing data were not considered. Simple logistic regression (SLR) was used to examine the relationship between each pathogen's prevalence and the explanatory variables. Covariates that were significantly associated with pathogen infection or exposure at an  $\alpha$ -level of 0.10 were considered for further analysis. To select independent variables, rat-related covariates were tested for multicollinearity using Spearman's rank correlation ( $\rho > 0.7$ ) with the Hmisc package in R, whereas socioeconomic covariates were described with a principal component analysis (PCA) using the FactoMineR package in R. From the PCA result, one variable per main axis was chosen based on the comprehensiveness of the data. Selected covariates were incorporated into multivariate models.



Table 2. The percentage of positive tests for each pathogen and the distribution of positive test results among the performed tests

Pathogens (no. of rats tested)	<i>L. interrogans</i> (n = 171)	SEOV (n = 127)	HEV (n = 142)	<i>T. gondii</i> (n = 77)
Percentage of positive tests	26% (n = 45/171)	14% (n = 18/127)	14% (n = 20/142)	8% (n = 6/77)
95% Confidence intervals	20–33%	8–20%	8–20%	2–14%
Tests	RT-PCR	Nested PCR	RT-PCR	MAT
Materials	Kidney	Lung	Liver	Blood blot
No. of positive tests	44	18	18	6
				Bioassay Heart 0

The variation inflation factors were calculated with the car package in R to verify a low effect of potential collinearity ( $<5$ ).

When the effect of rat death during capture was significantly associated with the infection status in SLRs, the data set was adjusted to account for a possible sample alteration effect.

For each pathogen, two multivariate logistic regression models were implemented. The selected co-variables were incorporated into a generalized linear model (GLM) as fixed effects. The final GLM was selected using Aikake's Information Criterion (AIC) to balance model fit and parsimony. Then, the adjusted effects of the variables included in the final GLM were estimated with a generalized linear mixed model (GLMM) to control for the random effect of trapping locations and to account for the potential effects of clustering.

The remotely sensed data extracted from the quadrats were considered for each socioeconomic variable included in the final GLMs. A new set of models was created to account for the possible influence of changing spatial scales on the adjusted effects.

## RESULTS

### Rat population

During the two collection periods (37 and 39 days), 178 rats were trapped and sampled (54% male). About two-thirds (63%) of the rats were adults, and 18 of the 58 adult females were pregnant (31%). The ratio of sexually immature to mature rats was similar between the farm (ratio = 40:54) and city centre (ratio = 43:58) sites. However, at the city centre sites, the ratio was lower in dwellings (ratio = 5:37) than in industrial areas (ratio = 19:4).

### Pathogen detection

Norway rats were the primary carrier and potential shedder of *L. interrogans* (26% prevalence), SEOV (14%), and rat-specific-HEV (14%). Eight per cent of the rats with a MAT titre of  $\geq 1:6$  were previously exposed to *T. gondii*. Among the 77 hearts, 58 were bioassayed in mice. Twenty-four bioassays were inconclusive because the mice did not survive past 48 h post-infection, and *T. gondii* was not isolated from the 34 other bioassays (Table 2).

Among 120 Norway rats screened for *L. interrogans*, SEOV, and HEV, 50 (42%) were infected with at least one pathogen. A single pathogen was detected

in the majority of infected rats ( $n=31/50$ ); the rest were co-infected with at least two agents. The proportion of rats infected with SEOV or HEV ( $n=34$ ) and co-infected with *L. interrogans* ( $n=19$ ) was significantly higher than the proportion of rats infected by *L. interrogans* alone (Pearson's  $\chi^2=14.63$ , D.F. = 1,  $P=0.0001$ ); the odds ratio (OR) of being co-infected by *L. interrogans* and SEOV or HEV was 5.54 [95% confidence interval (CI) 2.1–14.4]. Three of the infected rats were simultaneously carrying *L. interrogans*, SEOV, and HEV (see Supplementary online material).

The percentage of infected rats at the trapping sites varied: 0–65% for *L. interrogans*, 0–30% for SEOV, 0–61% for HEV, and 0–25% for *T. gondii*. The spatial distribution of sites with significantly higher or lower infected rats differed among the four pathogens. Nevertheless, high prevalence clusters were encountered for each pathogen in the Lyon region (Fig. 1).

For each pathogen, Pearson's coefficient which characterized the relationship between the capture success and the number of infected rats was not significantly different from zero (all  $P$  values  $>0.14$ ). Thus, no correlation between the capture success and the number of infected individuals could be demonstrated.

### Characterization of infection correlates in rats

#### *L. interrogans* carriage

From the SLR models, the OR of testing positive for *L. interrogans* was greater in sexually mature rats than in sexually immature rats. However, no significant relationship was observed between the infected rats and gender, body condition, or pregnancy (Table 3). The relationship between 10 normalized socioeconomic covariates and *L. interrogans* positivity was statistically significant (all  $P$  values  $\leq 0.05$ ).

The multivariate analyses incorporated sexual maturity, human population density (HPD), and median income as independent covariates (multicollinearity test results are not shown). In the final GLM, the OR of being *L. interrogans*-positive was greater in adults than juveniles (OR 4.0, 95% CI 1.6–9.9), and the OR increased with increasing normalized HPD (OR 1.8, 95% CI 1.2–2.7) and decreasing normalized income (OR 0.6, 95% CI 0.4–0.9). The relationship between these variables and *L. interrogans* positivity aligned but with decreased magnitude compared to the SLR. After controlling for clustering trapping locations using GLMMs, the ORs were nearly identical to the ORs obtained with a GLM. The estimated

variance for the random effect of trapping locations was 0.007% of the total residual variance. The GLM was maintained for further analysis and used as the simplest model.

Among 155 rats analysed, 30% ( $n=47$ ) died after trapping and were frozen and thawed before dissection. The OR of being *L. interrogans*-positive was greater for the surviving rats and the fresh samples compared to the frozen rats. Because there was a strong correlation between rat freezing and rat survival in the field, the effects of freezing and survival could not be differentiated. After adjusting the model for rat survival, the relationships between explanatory variables and *L. interrogans* positivity were similar to the results from the model that was not adjusted for survival. The relationships from the adjusted model were as follows: sexual maturity (OR 3.4, 95% CI 1.3–8.5), normalized HPD (OR 1.9, 95% CI 1.2–2.8), and normalized income (OR 0.6, 95% CI 0.4–0.8).

#### SEOV carriage

The results from the SLR models suggested that the OR of being SEOV-positive was greater in sexually mature rats than in sexually immature rats. There was no significant difference in the relationships between body condition, gender or pregnancy, and SEOV positivity. The relationships between seven normalized socioeconomic covariates and SEOV positivity were statistically significant (all  $P$  values  $\leq 0.05$ ).

The multivariate analyses incorporated sexual maturity, HPD, and income as independent covariates. In the final GLM, sexual maturity and the normalized incomes of the population were retained. The OR of being SEOV-positive increased with decreasing normalized income (OR 0.5, 95% CI 0.3–0.8) and appeared to be greater in adults than juveniles, although not statistically significant (OR 6.2, 95% CI 1.1–34) for the latter group. In bivariate analyses, the relationship between these variables and SEOV positivity aligned but with increased magnitude. Similar results were obtained by accounting for clustering of the trapping locations in a GLMM. In the selected GLMM, the estimated variance for the random effect of trapping locations was 8.88, accounting for 99% of the total residual variance.

#### HEV carriage

The results from the SLR models suggested that the OR of being HEV-positive was greater in sexually



**Fig. 1.** The distribution of clusters of low (full triangle) and high (star) prevalences of the four pathogens detected in rats trapped in the Rhône department, France.

Table 3. *Unadjusted and adjusted odds ratios for testing positive for Leptospira interrogans, SEOV, HEV or Toxoplasma gondii among Norway rats*

Covariates	Modes	<i>L. interrogans</i> status ( <i>n</i> =171)			SEOV status ( <i>n</i> =127)			HEV status ( <i>n</i> =142)			<i>T. gondii</i> status ( <i>n</i> =77)		
		SLR OR	GLM aOR	GLMM* aOR	SLR OR	GLM aOR	GLMM† aOR	SLR OR	GLM aOR	GLMM‡ aOR	SLR OR	GLM aOR	GLMM aOR
Survival after trapping	Dead	Ref.	—	—	Ref.	—	—	Ref.	—	—	n.a.	—	—
	Alive	<b>2 (1·1–3·6)</b>	—	—	2·2 (0·9–5·2)	—	—	1·2 (0·5–2·8)	—	—	—	—	—
Rat preservatives	Frozen	Ref.	—	—	Ref.	—	—	Ref.	—	—	n.a.	—	—
	Fresh	<b>3·3 (1·5–7·4)</b>	—	—	1·7 (0·6–4·5)	—	—	1·2 (0·5–3·1)	—	—	—	—	—
Sex	Female	Ref.	—	—	Ref.	—	—	Ref.	—	—	n.a.	—	—
	Male	1·7 (0·9–3·2)	—	—	1·5 (0·6–3·6)	—	—	1 (0·4–2·4)	—	—	—	—	—
Maturity	Juvenile	Ref.	Ref.	—	Ref.	—	—	Ref.	—	—	n.a.	—	—
	Adult	<b>7·3 (3·1–16·6)</b>	<b>4·0 (1·6–9·9)</b>	<b>4·0 (1·3–11·9)</b>	<b>9 (1·6–55)</b>	6·2 (1·1–34)	10·5 (0·8–138)	<b>4·4 (1·5–14·3)</b>	2·2 (0·7–7)	2·6 (0·5–14·7)	—	—	—
Pregnancy	No	Ref.	—	—	Ref.	—	—	Ref.	—	—	n.a.	—	—
	Yes	1·5 (0·5–4·1)	—	—	0·4 (0·1–2·5)	—	—	1·1 (0·2–5)	—	—	—	—	—
Body condition		1 (0·9–1·0)	—	—	1 (0·9–1)	—	—	0·9 (0·9–1·0)	—	—	<b>1·02 (1·01–1·03)</b>	—	—
Human population		<b>3·2 (2·3–4·3)</b>	<b>1·8 (1·2–2·7)</b>	<b>1·8 (1·1–2·9)</b>	<b>1·9 (1·3–2·7)</b>	—	—	<b>1·7 (1·2–2·4)</b>	—	—	1·2 (0·7–2·3)	—	—
Incomes (median)		<b>0·3 (0·2–0·4)</b>	<b>0·6 (0·4–0·9)</b>	<b>0·6 (0·3–0·9)</b>	<b>0·4 (0·3–0·7)</b>	<b>0·5 (0·3–0·8)</b>	0·4 (0·1–2·1)	<b>0·3 (0·2–0·5)</b>	<b>0·4 (0·2–0·6)</b>	<b>0·3 (0·1–0·8)</b>	1·3 (0·8–2·2)	—	—
Population expansion		1·1 (0·8–1·5)	—	—	1·4 (0·9–2·3)	—	—	1·4 (0·9–2·2)	—	—	1·7 (0·8–3·9)	—	—
Population age		<b>0·6 (0·4–0·9)</b>	—	—	0·2 (0·02–1·3)	—	—	0·1 (0·01–1·2)	—	—	0·7 (0·4–1·4)	—	—
Per cent flat		<b>2·6 (1·9–3·6)</b>	—	—	1·6 (0·9–2·5)	—	—	1·5 (0·9–2·2)	—	—	0·7 (0·3–1·6)	—	—
Per cent small flat		<b>3·0 (2·1–4·2)</b>	—	—	<b>1·6 (1·1–2·6)</b>	—	—	<b>1·5 (1·0–2·3)</b>	—	—	1·1 (0·4–2·8)	—	—
Ratio renter/owner		<b>4·2 (2·2–8·0)</b>	—	—	0·6 (0·3–1·1)	—	—	0·5 (0·3–1·1)	—	—	1·2 (0·8–2·0)	—	—
Ratio LID		<b>3·1 (2·3–4·3)</b>	—	—	<b>2·7 (1·7–4·2)</b>	—	—	<b>2·4 (1·6–3·6)</b>	—	—	0·9 (0·5–1·6)	—	—
Level of graduation		<b>2·8 (2·1–3·8)</b>	—	—	<b>2·2 (1·5–3·2)</b>	—	—	<b>2·8 (1·8–4·1)</b>	—	—	0·1 (0·0–7·3)	—	—
Family size		<b>3·1 (2·3–3·4)</b>	—	—	<b>2·6 (1·7–4·1)</b>	—	—	<b>2·6 (1·7–3·9)</b>	—	—	0·8 (0·5–1·5)	—	—
Rate of unemployment		<b>3·1 (2·3–4·2)</b>	—	—	<b>2·3 (1·5–3·4)</b>	—	—	<b>2·5 (1·7–3·8)</b>	—	—	0·8 (0·5–1·4)	—	—

SLR, Simple logistic regression; GLM, generalized linear model; GLMM, generalized linear mixed model; OR, odds ratio; aOR, adjusted odds ratio; n.a., not applicable; LID, low-income dwelling.

\* Variance of the random effect = 0·007.

† Variance of the random effect = 1·7.

‡ Variance of the random effect = 8·9.

All results in bold were significantly different from 1 at  $\alpha \leq 0·05$ .

Table 4. Adjusted odds ratios using the final GLM or GLMM and incorporating the human population density (HPD) and median income (MI) by quadrat (a, b, c, d)

Covariates		<i>L. interrogans</i> status*			SEOV status†			HEV status‡		
		aOR	95% CI	P	aOR	95% CI	P	aOR	95% CI	P
Maturity	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	<b>3.4</b>	<b>(1.4–8.5)</b>	<b>0.01</b>	9.3	(0.7–124)	0.09	2.1	(0.4–11.4)	0.38
	HPD (a)	<b>2.0</b>	<b>(1.4–2.9)</b>	<b>0.01</b>	—	—	—	—	—	—
MI (a)	Juveniles	0.7	(0.5–1.0)	0.19	0.4	(0.03–5.8)	0.44	0.3	(0.1–0.7)	0.007
	Adults	<b>3.6</b>	<b>(1.8–8.9)</b>	<b>0.02</b>	7.9	(0.6–100)	0.11	3.9	(0.6–24.8)	0.14
	HPD (b)	<b>2.1</b>	<b>(1.5–3.0)</b>	<b>&lt;0.001</b>	—	—	—	—	—	—
MI (b)	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	<b>3.6</b>	<b>(1.8–8.9)</b>	<b>0.02</b>	7.9	(0.6–100)	0.11	3.9	(0.6–24.8)	0.14
	HPD (b)	<b>2.1</b>	<b>(1.5–3.0)</b>	<b>&lt;0.001</b>	—	—	—	—	—	—
MI (b)	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	<b>3.2</b>	<b>(1.3–8.3)</b>	<b>0.04</b>	7.9	(0.6–100)	0.11	4.6	(0.8–27)	0.03
	HPD (c)	<b>2.8</b>	<b>(2.0–4.1)</b>	<b>&lt;0.001</b>	—	—	—	—	—	—
MI (c)	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	<b>3.2</b>	<b>(1.3–8.3)</b>	<b>0.04</b>	7.9	(0.6–100)	0.11	4.6	(0.8–27)	0.03
	HPD (c)	<b>2.8</b>	<b>(2.0–4.1)</b>	<b>&lt;0.001</b>	—	—	—	—	—	—
MI (c)	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	<b>3.8</b>	<b>(1.5–9.3)</b>	<b>0.01</b>	6.8	(0.5–84)	0.13	4.3	(0.7–27.9)	0.126
	HPD (d)	<b>2.3</b>	<b>(1.6–3.4)</b>	<b>&lt;0.001</b>	—	—	—	—	—	—
MI (d)	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	<b>3.8</b>	<b>(1.5–9.3)</b>	<b>0.01</b>	6.8	(0.5–84)	0.13	4.3	(0.7–27.9)	0.126
	HPD (d)	<b>2.3</b>	<b>(1.6–3.4)</b>	<b>&lt;0.001</b>	—	—	—	—	—	—
MI (d)	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	<b>3.8</b>	<b>(1.5–9.3)</b>	<b>0.01</b>	6.8	(0.5–84)	0.13	4.3	(0.7–27.9)	0.126
	HPD (d)	<b>2.3</b>	<b>(1.6–3.4)</b>	<b>&lt;0.001</b>	—	—	—	—	—	—
MI (d)	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	<b>3.8</b>	<b>(1.5–9.3)</b>	<b>0.01</b>	6.8	(0.5–84)	0.13	4.3	(0.7–27.9)	0.126
	HPD (d)	<b>2.3</b>	<b>(1.6–3.4)</b>	<b>&lt;0.001</b>	—	—	—	—	—	—
MI (d)	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	<b>3.8</b>	<b>(1.5–9.3)</b>	<b>0.01</b>	6.8	(0.5–84)	0.13	4.3	(0.7–27.9)	0.126
	HPD (d)	<b>2.3</b>	<b>(1.6–3.4)</b>	<b>&lt;0.001</b>	—	—	—	—	—	—

aOR, Adjusted odds ratio; CI, confidence interval.

\* aOR, 95% CI and *P* values obtained using the final *L. interrogans* GLM.

† aOR, 95% CI and *P* values obtained using the final SEOV GLMM.

‡ aOR, 95% CI and *P* values obtained using the final HEV GLMM.

mature rats than sexually immature rats. The relationships between eight normalized socioeconomic covariates and HEV positivity were statistically significant (all *P* values  $\leq 0.05$ ).

The multivariate analyses used sexual maturity, HPD, and income as independent covariates. In the final GLM, sexual maturity and normalized income were retained. The OR of being HEV-positive increased with decreasing normalized income (OR 0.4, 95% CI 0.2–0.6) and appeared to be greater in adults than juveniles, although results in the latter group were not statistically significant (OR 2.2, 95% CI 0.7–7). In bivariate analyses, the relationship between these variables and HEV positivity aligned but with increased magnitude. Similar results were obtained by accounting for clustering trapping locations using a GLMM. In the selected GLMM, the estimated variance for the random effect of trapping locations was 1.631, accounting for 7% of the total residual variance.

#### *T. gondii* exposure

The results from the SLR models suggested that only body mass was significantly higher in rats exposed to

*T. gondii* ( $P \leq 0.05$ ). Thus, the multivariate analysis was not investigated.

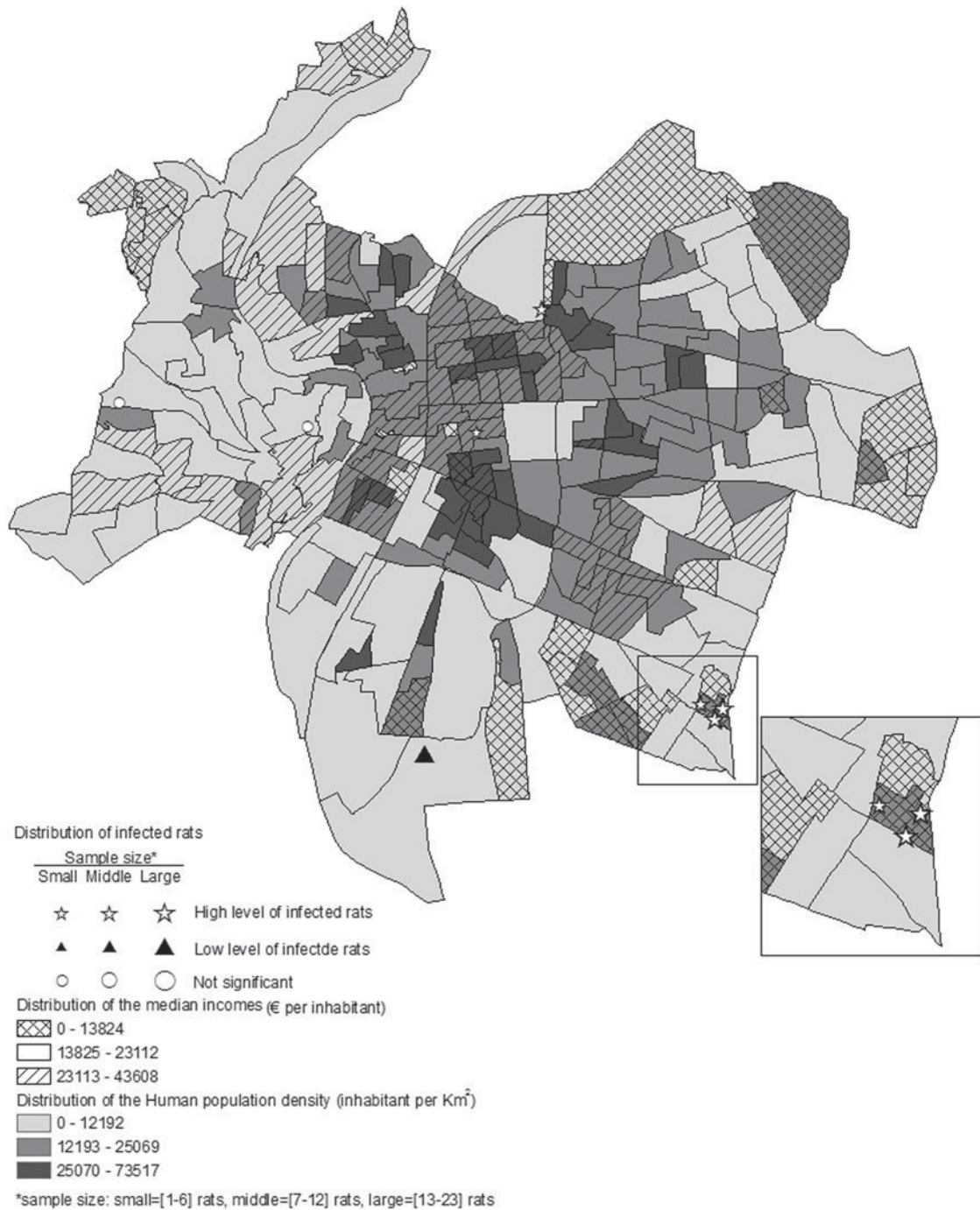
#### Test of the spatial extents of remotely sensed extracted data

The new datasets extracted from the four quadrats were incorporated into the final models selected for *L. interrogans* infection status (see Supplementary online material). The *P* values associated with the relationship between infection status and the covariates decreased with increasing quadrat size. Larger quadrats displayed a better goodness-of-fit model (Table 4). Spatial distributions of the covariates are shown in Figure 2; areas of higher and lower levels of *L. interrogans* infection were mainly located in densely populated and low-income areas.

#### DISCUSSION

This study evaluated the risks of four potentially zoonotic pathogens in Norway rats in Lyon. We demonstrated that rats in human habitats were infected or exposed and probably shed *L. interrogans*, SEOV, HEV, and *T. gondii*. Based on logistic regression





**Fig. 2.** The spatial distribution of human population density and median incomes in Lyon city centre overlaid with high and low prevalence of *L. interrogans* carriage in Norway rats.

models, our study suggests that populated and/or low-income areas of the Rhône department may encompass an increased number of infected rats. Below, the spatially explicit approach and detection methods are expanded upon to explain how the identified risk factors might be used in targeted surveillances.

### Spatial analysis methodology

The risk analysis demonstrated an overlap of densely populated, low-income urbanized areas and Norway rats with *L. interrogans*, SEOV, and HEV infections. Socioeconomic data collected by the INSEE census are most commonly aggregated at the administrative

boundary or census areal unit level. Spatial scale can affect the strength and significance of statistical associations, which is known as the modifiable areal unit problem (MAUP) [23]. To minimize the MAUP effect in statistical inference, the covariates can be analysed at hierarchical levels of areal units from the finest to the coarsest resolution to confirm consistent model results [24]. Five hierarchical levels of census units were used in this study. Only the smallest unit failed to confirm the relationship between socioeconomic data and *L. interrogans* positivity, suggesting that HPD and median incomes are robust covariates in predicting the *L. interrogans* infection status in rats, as the ORs were similar when the spatial scale was changed. The ability of HPD and income to predict *L. interrogans* infection in rats aligns with previous studies demonstrating the distribution of human leptospirosis in impoverished inner-city areas [25].

### Pathogen detection

Generally, screening tests used in wildlife species were developed for humans or domestic species and do not have gold standards, as in the case of wild rats. Bacteria recovery from an individual kidney by bacteriological culture was used as the definitive diagnostic of *L. interrogans* and was considered to be appropriate for early detection because kidney colonisation occurs in the first week of *Leptospira* infection [26]. However, this culturing method is insensitive, and the bacterial isolation frequency is typically low. Thus, qPCR was also performed because it is reportedly the most sensitive human analysis [27]. False negatives can still be obtained when PCR is used for undescribed pathogenic strains [28] or the bacteria are aggregated in an unsampled part of the kidney. Therefore, a combination of culture and qPCR was relevant; one positive culture and negative PCR were observed in this study. This combination is expected to provide a reliable reflection of *Leptospira* infection in rats. Nevertheless, we found that negative tests were more likely to occur in dead rats for which PCR inhibitors might be responsible for false-negative results [29]. This result suggests that the prevalence, although consistent with a previous survey in France, might be underestimated [4].

The previously reported sequences of SEOV and HEV [18, 19] demonstrate their presence in individuals. Although several lung and liver lobes were sampled, detection may fail when the viral load is not homogeneously distributed throughout the

organs, and areas clear of infection are collected. The combination of HEV-PCR detection on liver and faeces optimized HEV RNA detection; indeed, two individuals were liver-negative and faeces-positive, suggesting that this study may provide an appropriate reflection of rat infection. In addition, the observed prevalence was consistent with previous surveys [30, 31]. Conversely, the prevalence of SEOV might be underestimated.

In domestic animals, the MAT titres of 1:20–1:25 have been validated to detect IgG antibodies to *T. gondii* in sera [32]. The choice of cut-off is usually raised when interpreting serological tests developed for domestic species or humans. In other wildlife species, 1:6 is a biologically relevant threshold because many individuals with titres of 1:6 carry *Toxoplasma* cysts [33]. However, given the low antibody levels of some individuals, all individuals were bioassayed when possible. The absence of *Toxoplasma* detection in mice could be caused by a previous infection that resulted in persistent antibodies, the absence of the parasite in the heart, or parasite death during sample transport. Nonetheless, the 8% of rats exposed to *T. gondii* in the Lyon region and the variation between sites was in agreement with a recent survey in France [34].

### Towards a RBZ-targeted surveillance

Considering the propensity of rats to carry zoonotic pathogens, a public health surveillance programme should be developed. However, using aggregated data may misestimate the prevalence, as aggregate data have a heterogeneous spatial distribution. Thus, risk-based surveillance combining the risk of zoonotic pathogen shedding in rats and the risk of rat-human proximity should be developed to assess and mitigate the spread of RBZs. As the transmission of the four pathogens in rats relies on direct (i.e. behavioural) and indirect (i.e. environmental) contacts, both features should be considered to target surveillance and interpret results.

The zoonosis carriage risk in rats appears to be influenced by the colony's age structure. In our study, sexual maturity (particularly increased age) was identified as a risk factor for *L. interrogans*, SEOV, and HEV, as previously described [35, 36]. The potential influence of age on infection status may result from the presence of maternal antibodies, which can persist for several months in rat neonates [37]. Rat infections are also more likely to be acquired with exploratory

behaviour development, which increases with sexual maturity. No male bias was revealed in this study although the likelihood of males acquiring SEOV would be greater due to them having more aggressive encounters and as wounds would be the primary route of SEOV transmission between adult males [38]. Nevertheless, a longitudinal study on rodents revealed that the male bias observed in the prevalence of antibody to hantaviruses varied among trapping sites and was more likely due to habitat, social structure or behavioural variations [39]. The absence of male bias in the present study may be related to its short-term design or to site criteria. Thus, stratified sampling and the colony's age structure should be considered to provide a relevant estimate of RBZ carriage.

We observed a robust relationship between rat infection and socioeconomic covariates which more likely results from a confounding effect of the socioeconomic factors with genuine causal factors. The micro-environment features are suspected to be a causal factor involved in pathogen transmission. As Himsworth *et al.* suggested regarding the relationship between micro-environmental features and *Leptospira* prevalence (i.e. environmental factors likely related to variations in *Leptospira* prevalence) [40], our study additionally suggests to focus on environments associated with dense populations and areas with lower incomes. In this way, the results obtained partially answer a previous report on RBZs highlighting the necessity for public health officials to define environmental features that promote pathogen transmission in rats [41]. By suggesting the infected rat distribution patterns, the socio-economic factors could aid targeting and enhancing surveillance. In addition, the effect of socio-economic factors could result from the related effect of rat population size which may increase in lower income areas because of lower hygiene and lower pest control measures. In our study, the effect of the capture success on the number of infected rats was not revealed and could be explained by its low ability to estimate the population size or specific transmission schemes not population-size-related. Indeed, the rat capture success does not merely depend on population size but also on resources, shelter, age structure of the population or pre-poisoning. Furthermore, the usual method of rodent trapping using grids or transects may not be adapted to urban environments since there are a number of physical barriers as well as adverse effects of human activities. The understanding of the potential ways of

pathogen transmissions (vertical *vs.* horizontal, direct contact *vs.* environment) and their relative importance is limited. The population density effect on pathogen prevalence might not be the rule in rat colonies as previously suggested for *L. interrogans* infections [40] although it may depend on the pathogens or colonies. As there is no standard to assess the urban rat population size, a critical lack of information limits our study to exploratory work dedicated to suggesting new approaches for the study of RBZ risks.

## CONCLUSION

This study enhances knowledge of the spatial distribution of zoonotic pathogens in Norway rats from the Rhône department. The results suggest that the risk of RBZs is greater in densely populated and lower income areas of Rhône. Given the unprecedented rate of global urbanization and poverty, this study suggests the development of appropriate risk-based surveillance of zoonotic pathogens in Norway rats by targeting reliable indicators of areas with high exposure risks. Although further investigations are required to confirm and refine these findings and to assess the exposure risk in humans, this type of surveillance is required to assess and mitigate the spread of RBZs and to control their potential transmission to humans.

As part of a comprehensive risk assessment, this study should improve prevention measures in the context of a typical 'One Health' approach.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

For supplementary material accompanying this paper visit <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268814001137>.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the city of Lyon and its 'Service d'hygiène' (Dr. Gilbert Gault), the waste plant UIOM de Lyon (M Joël Baud), the Parc de la Tête d'Or managers (Dr. David Gomis and Dr. Guillaume Douay), and the Agence d'urbanisation for assisting with rat and census data collection. We thank Philippe Berny and Joffrey Goullois for assisting with rat collections, Emmanuelle Gilot-Fromont for assisting with diagnosis and analysis, Zorée Djelouadji and Lorraine McElhinney (AHVLA) for assisting with screening for *Leptospira* and Seoul virus, respectively, and the Institut National Géographique et Forestière (IGN)



for providing census data. The hantavirus identification was funded by the Defra Surveillance Project SV3037.

This project was supported by the European Commission under the Food, Agriculture and Fisheries and the Biotechnology theme of the Seventh Framework Programme for Research and Technological Development (grant no. 222633), WildTech project WP6 Epidemiology and Risk assessment.

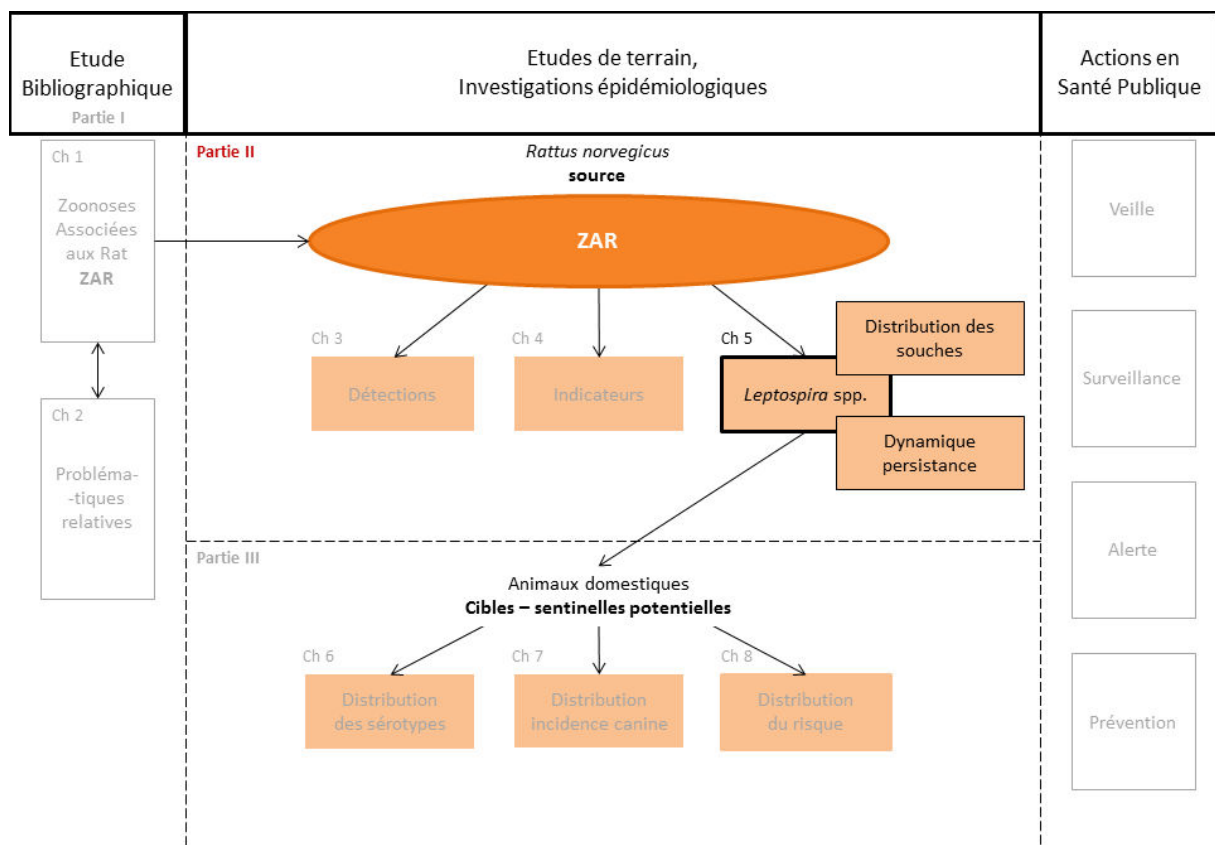
## DECLARATION OF INTEREST

None.

## REFERENCES

1. Jones KE, *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; **451**: 990–993.
2. Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology* 2009; **35**: 221–270.
3. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences* 2008; **33**: 557–569.
4. Aviat F, *et al.* Leptospira exposure in the human environment in France: a survey in feral rodents and in fresh water. *Comparative Immunology, Microbiology, and Infectious Diseases* 2009; **32**: 463–476.
5. Socolovschi C, *et al.* Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *International Journal of Infectious Diseases* 2011; **15**: e710–e715.
6. Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *The Journal of General Virology* 1996; **77**: 2677–2687.
7. Jameson LJ, *et al.* The continued emergence of hantaviruses: isolation of a Seoul virus implicated in human disease, United Kingdom, October 2012. *Eurosurveillance* 2013; **18**: 4–7.
8. Macé G, *et al.* Severe Seoul hantavirus infection in a pregnant woman, France, October 2012. *Eurosurveillance* 2013; **18**: 20464.
9. Krüger DH, Schönrich G, Klempa B. Human pathogenic Hantaviruses and prevention of infection. *Human Vaccines* 2011; **7**: 685–693.
10. Olsson GE, *et al.* Demographic factors associated with hantavirus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerging Infectious Diseases* 2002; **8**: 924–929.
11. Johne R, *et al.* Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **16**: 1452–1455.
12. Wolf S, *et al.* The simultaneous occurrence of human norovirus and Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Archives of Virology* 2013; **158**: 1575–1578.
13. Lack JB, Volk K, Van Den Bussche RA. Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerging Infectious Diseases* 2012; **18**: 1268–1273.
14. Jones J, Lopez A, Wilson M. Congenital toxoplasmosis. *American Family Physician* 2003; **67**: 2131–2138.
15. Sarkar U, *et al.* Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; **66**: 605–610.
16. Thurdfield M. *Veterinary Epidemiology*, 3rd edn. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2007, pp. 232–242.
17. Zuerner RL. Laboratory maintenance of pathogenic Leptospira. *Current Protocols in Microbiology* 2005; chapter 12: unit 12E.1.
18. Dupinay T, *et al.* Detection and genetic characterization of Seoul virus from commensal brown rats in France. *Virology Journal* 2014; **11**: 32.
19. Widèn F, *et al.* Detection of potentially zoonotic hepatitis E virus in rats captured in an urban area in Lyon France during 2011 and 2012. *Virology Journal* (in press).
20. Dubey JP, Desmonts G. Serological responses to equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal* 1987; **19**: 337–339.
21. Villena I, *et al.* Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**: 4035–4039.
22. Sokal RR, Rohlf FS. *Biometry*. New York: W. H. Freeman, 1981.
23. Diez-Roux AV. Multilevel analysis in public health research. *Annual Review of Public Health* 2000; **21**: 191–192.
24. Unwin DJ. GIS spatial analysis and spatial statistics. *Progress in Human Geography* 1996; **20**: 540.
25. Oliveira DS, *et al.* The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2009; **103**: 149–157.
26. Athanazio DA, *et al.* *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonisation by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropica* 2008; **105**: 176–180.
27. Bharti AR, *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases* 2003; **3**: 757–771.
28. Bourhy P, *et al.* Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira spp.* in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; **49**: 2154–2160.
29. Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition – a review. *Forensic Science International: Genetics* 2012; **6**: 297–305.
30. Zhang YZ, *et al.* Hantavirus infections in humans and animals, China. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **16**: 1195–1203.
31. Kanai Y, *et al.* Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around a pig farm. *BMC Research Notes* 2012; **5**: 4.
32. Dubey JP. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. *Veterinary Parasitology* 1997; **71**: 307–310.

33. **Richomme C, et al.** Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Veterinary Parasitology* 2009; **164**: 296–300.
34. **Gotteland C, et al.** Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology* 2013; **18**: 1–10.
35. **Easterbrook JD, et al.** A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiology and Infection* 2007; **135**: 1192–1199.
36. **Hannah MF, Bajic VB, Klein SL.** Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 2008; **22**: 503–516.
37. **Dohmae K, Nishimune Y.** Protection against hantavirus infection by dam's immunity transferred vertically to neonates. *Archives of Virology* 1995; **140**: 165–172.
38. **Hinson ER, et al.** Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004; **70**: 310–317.
39. **Calisher CH, Wagoner K.** Demographic factors associated with prevalence of antibody to Sin Nombre virus in deer mice in the Western United States. *Journal of Wildlife Diseases* 2007; **43**:1–11.
40. **Himsworth CG, et al.** Ecology of *Leptospira interrogans* in Norway rats (*Rattus norvegicus*) in an inner-city neighborhood of Vancouver, Canada. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013; **7**: e2270.
41. **Himsworth CG, et al.** Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 2013; **13**: 349–359.



## CHAPITRE 5:

### FOCUS SUR *LEPTOSPIRA INTERROGANS*

La leptospirose humaine est une ZAR potentiellement fatale et d'importance majeure en ce qui concerne l'incidence mondiale (5 cas/100 000 pers.an<sup>-1</sup> d'après l'OMS<sup>1</sup>). En France, l'incidence était de 1 cas/100 000 pers.an<sup>-1</sup> en 2014, une valeur supérieure à 2013 qui déjà était l'incidence la plus élevée des 10 dernières années (Picardeau, 2015). Le rat est rapporté comme la source principale de ces cas en milieu urbain (Evangelista et Coburn, 2010) et nos résultats suggèrent que *L. interrogans* est le pathogène prépondérant parmi les agents investigués chez les rats dans le Rhône (cf. chapitre 3). Une connaissance de la répartition des rats infectés est donc nécessaire pour développer des stratégies de maîtrise de l'infection chez le rat et par conséquent de la maladie chez l'Homme; cependant, les mécanismes épidémiologiques chez les rats, en particulier les déterminants de la persistance bactérienne inter colonies et intra colonies, restent insuffisamment compris.

Ce chapitre propose une caractérisation de la persistance inter colonies à partir de la détermination des souches circulantes par «multispacer sequence typing». Une piste d'investigation des déterminants environnementaux de la persistance intra colonie par la modélisation dynamique est ensuite présentée.

- 5.1. Distribution de *L. interrogans* circulant par «multispacer sequence typing»
- 5.2. Dynamique de persistance

---

<sup>1</sup> [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501521\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501521_eng.pdf) consulté le 09/03/2015

## 5.1. Distribution de *L.interrogans* circulant par multispacer sequence typing

### Introduction

Les outils moléculaires, de plus en plus performants pour discriminer les micro-organismes à des niveaux fins de la taxinomie (souches), sont désormais à la base des investigations épidémiologiques dites moléculaires. Le rat surmulot est l'hôte principal de *Leptospira interrogans* selon la classification génomique et de *Leptospira* sérovars Icterohaemorrhagiae selon la classification sérologique (Adler et de la Peña Moctezuma, 2010; Ko *et al.*, 2009; Levett, 2001). Identifier l'espèce ou le séovar de leptospires circulant parmi les rats est donc insuffisant pour discriminer les souches; or, discriminer les leptospires apporterait de nouvelles perspectives pour les études épidémiologiques, en particulier sur la dynamique de transmission et de persistance chez les rats et sur la reconnaissance de la source d'infection d'un foyer humain.

Dans le cadre de ces travaux (*cf.* chapitre 3.5), une méthode appelée «multispacer sequence typing» a été développée pour identifier les souches de *L. interrogans* isolées chez les rats et l'Homme (Zilber *et al.*, 2014). Contrairement aux autres méthodes de typage telles que la méthode «variable number tandem repeat» (VNTR) ou «multiple locus sequence typing» (MLST), les séquences ciblées sont intergéniques et potentiellement plus variables que les séquences intragéniques ciblées dans la VNTR. Cette différence permet de discriminer les sérovars de *L. interrogans* à l'échelle de la souche là où les autres méthodes se limitent à l'identification de l'espèce, du séogroupe ou du séovar.

Nous avons appliqué la méthode MST aux rats capturés et étudiés à Lyon (*cf.* chapitre 3.2). L'objectif était de décrire les souches circulant parmi des colonies de rats à Lyon et de caractériser le profil de distribution de ces souches. Les résultats devraient permettre de tester trois hypothèses de profil de distribution: (1) une seule souche présente à l'échelle de la ville, (2) plusieurs souches coexistantes avec une distribution d'apparence aléatoire ou (3) plusieurs souches coexistantes avec une distribution non aléatoire.

Les arguments en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses pourraient apporter une meilleure connaissance de la distribution des souches dans des colonies de rats à Lyon. En outre, ils pourraient apporter une meilleure compréhension des voies de circulation des leptospires inter colonies et des informations sur le comportement des colonies urbaines. Ces informations pourraient contribuer à expliquer l'hétérogénéité de la distribution des rats infectés en milieu urbain, question restée jusque-là sans réponse malgré de nombreuses études (Ayrat *et al.*, 2014; Himsworth *et al.*, 2013c; Koizumi *et al.*, 2009; Krøjgaard *et al.*, 2009).

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis à *PLoS ONE* le 29/04/2015, dont le texte est intégralement reproduit ci-après.

Distribution of *Leptospira interrogans* by multispacer sequence typing  
in urban Norway rats (*Rattus norvegicus*),  
a survey in France 2012-2013

F. AYRAL<sup>1\*2</sup>, A.-L. ZILBER<sup>1</sup>, D. J. BICOUT<sup>3</sup>, A. KODJO<sup>2</sup>,  
M. ARTOIS<sup>1</sup>, Z. DJELOUADJI<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>WildTech, USC1233, Univ. de Lyon-VetAgro Sup, FR - 69280 Marcy L'Etoile

<sup>2</sup>USC 1233, Laboratoire des Leptospires, VetAgro Sup, FR-69280 Marcy L'Etoile.

<sup>3</sup>Biomatématiques et Epidémiologie, EPSP-TIMC, UMR CNRS 5525, UFJ,  
VetAgro Sup, FR-69280, Marcy L'Etoile.

---

## ABSTRACT

### Background

Urban leptospirosis has increasingly been reported in both developing and developed countries. However, our understanding of basic aspects of the epidemiology, including the transmission routes of leptospires among rat populations, remains incomplete. Multispacer sequence typing (MST) is able to discriminate between *Leptospira* strains in rats; however, to our knowledge, the distribution of *Leptospira* strains among urban rat colonies has not been investigated using MST.

### Aims and Methodology

The objective of this study was to identify and characterize the *Leptospira* present in rats (*Rattus norvegicus*) in Lyon (France) using MST.

Kidneys and urine were collected from rats trapped live in seven locations in the city and in one suburban location. Each location was considered to represent a rat colony. Bacterial cultures and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assays were performed, and *L. interrogans* DNA identified was then genotyped using MST. The distributions of *Leptospira* strains were described using spatial analysis and Fisher's Exact Test or logistic regression models, if appropriate.

---

<sup>2</sup>\*Corresponding author:

F. Ayral, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy L'Etoile, France; E-mail: [florence.ayral@vetagro-sup.fr](mailto:florence.ayral@vetagro-sup.fr)

## Key results

Among 84 wild rats, the MST profiles were obtained in 35 of 37 rats that had a positive result for *Leptospira interrogans* by either bacterial culture and/or qPCR analyses. Species was performed and *L. interrogans* DNAs were genotyped. All the MST profiles were related to the serogroup Icterohaemorrhagiae, and the serovars (strain(s)) deduced were Copenhageni (Wijinberg/M20) (n=26), Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion) (n=7), Icterohaemorrhagiae (R1) (n=1) and Copenhageni (Shibaura 9) (n=1). Each colony was infected with leptospires having the same MST profile. The individual covariates (sex, age, weight and size) and the Icterohaemorrhagiae (Wijinberg/M20) carriage were not significantly associated when accounting for the location.

## Major conclusions

This study demonstrates that MST can be used for the purpose of field studies, either on culture isolates or DNA extracted from kidneys and urine, to discriminate between *L.interrogans* isolates in rats. MST can thus be used to monitor their distribution in urban rats from the same city, thereby providing new knowledge that can be used to explore the circulation of *L.interrogans* infection in rat colonies. Because the strains are related to those previously found in humans, this method is appropriate for source tracking and for providing information that can be used to guide future public health decisions.

## AUTHOR SUMMARY

Leptospirosis (infection with *Leptospira* spp.) is a public health concern worldwide. The Norway rat (*Rattus norvegicus*), as the most ubiquitous urban wildlife, is potentially the primary source of *Leptospira* spp. for humans, dogs and livestock. Urban leptospirosis has increasingly been reported in both developing and developed countries, and humans infected through exposure to the bacterium in rat urine can develop fever, renal failure, and pulmonary hemorrhage. Nonetheless, the source of infection is usually unknown. Previous studies of *Leptospira* carriage in rats have been of limited value because they have used detection methods that cannot distinguish between *Leptospira* strains. Using an appropriate method to identify *Leptospira* strains, we obtained results that suggest that each given strain can be found in a physically delimited space and that its presence in a location remains steady over time; thus, this methodology could be extended to larger scales and additional host species to map the spatial distribution of *Leptospira* strains. Because these strains are related to those



previously reported in humans, such a map could be used to identify and track leptospiral agents, facilitate our understanding of leptospirosis epidemiology and aid public health decisions in the future.

## INTRODUCTION

It has been estimated that more than one million severe cases of leptospirosis occur per year worldwide [1], and leptospirosis is considered to be an emerging disease in many countries [2]. The infection can cause fever, renal failure and pulmonary hemorrhage and is potentially fatal in 5% to 15% of cases [3-5]. It is a bacterial zoonosis caused by pathogenic *Leptospira*, resulting from direct or indirect contact with the urine or tissues of infected animals [6]. Although many animals can be carriers, rats are the most common source of human infection, particularly in urban environments, as rats are a synanthropic species (adapted to coexisting with the human population) [7-9]. Environmental factors also play a role in leptospirosis, leading to a higher incidence in tropical countries; however, because rats are ubiquitous, leptospirosis remains a public health issue in cities in both developing and developed countries [8-10].

Pathogenic species include *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi*, *L. alstonii* and *L. mayottensis* [11-13]. *Leptospira* can also be classified into approximately 300 serovars, based on the lipopolysaccharide (LPS) structure. Antigenically related serovars have been grouped into at least 25 serogroups [11]. Because the species identification is not related to the LPS-associated genes (i.e., O-antigen gene cluster), the molecular and the serology-based taxonomies do not entirely overlap [14]. Different serovars are adapted to different mammalian hosts, which can either act as a reservoir of a co-adapted *Leptospira* serovar or carry and disseminate other serovars [6]. It is therefore difficult to track strains with molecular identities or serotypes that continuously change with the hosts and the environmental niches they inhabit and pass through.

Previous studies have shown that the prevalence of pathogenic *Leptospira* in rats varies among different locations within the same city [15-18], even between populations only a short distance apart. The factors responsible for this geographic variability remain unknown. Nevertheless, there is considerable interest in the public health sector to identify and understand the factors responsible for the distribution of *Leptospira* within rat populations. This knowledge could help to predict at-risk areas of

leptospirosis transmission to humans and to target prevention and pest control efforts. Varied hypotheses about the demographic and behavioral structures of rat populations, the population abundance and the related microenvironment are currently being explored [17]. In an effort to define the determinants of *Leptospira* infection in rats, many surveys have been conducted [15-20]; however, the lack of knowledge of the populations to which the sampled rats belonged, the reduced numbers of rats sampled and the lack of refined ecologic data have usually led to incomplete answers.

As a novel approach, the identification and monitoring of the isolates circulating in urban rat populations could aid in the investigation of potential sources of contamination and their relative importance with a higher level of certainty. To successfully establish the epidemiological relationship between any two isolates, it is necessary to type them at a sufficient level of resolution [21]. Rats have been reported as the primary carriers of *Leptospira* serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni (i.e., the Icterohaemorrhagiae serogroup) [8]. Therefore, the molecular data on the leptospires circulating in urban rat populations at the serovar level are not sufficient, and opportunities to distinguish at the isolate level could provide new perspectives for epidemiological analysis and for source tracking, in particular.

Other than serological methods, molecular tools that have been employed to detect and genotype leptospiral agents in rat surveys include pulse field gel electrophoresis (PFGE), analyses of variable number tandem repeats (VNTR), and multi-locus sequence typing (MLST) [22-25]. However, these methods suffer from low discriminatory power and can only distinguish between *Leptospira* species, serogroups or serovars. O-genotyping could be a relevant method for identifying isolates; however, because of a lack of sequences of O-antigen gene clusters from various serogroups, this method has not been developed in *Leptospira*. Recently, multispacer sequence typing (MST) technology has been used and validated to distinguish between *L. interrogans* at the strain level in both human and animal samples [26]. The method can generate sequence data that are suitable for epidemiological and population studies. To our knowledge, no previous studies have yet applied MST for the purpose of a survey in wild rats.

The objectives of the study were as follows: (1) to identify the MST profile of *L. interrogans* isolates circulating in rat colonies in central Lyon, France, and in suburbs of Lyon; and (2) to characterize the distribution of MST profiles in rats over space and time using an epidemiological approach.

Based on the results of this study, the use of MST for the surveillance of *Leptospira* in animal hosts should be considered, and we offer a public health perspective on the potential for its use.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics statement

The authors assert that all procedures conducted in this study complied with the ethical standards of the European regulation governing the care and use of laboratory animals (agreement n° 69-020931, delivered by Rhône Préfecture).

### Study area

The study was conducted in Lyon (N45°45'/E4°50') and included seven trapping locations within the city center and one in a suburb. The eight urban trapping locations encompassed five dwelling areas: "Mermoz-B" N45°43'43.16"/E4°53'09.63", "Mermoz-F" N45°43'38.47"/E4°53'05.35", and "Mermoz-R" N45°43'44.96/E4°52'57.56" were from an inner-city neighborhood; "Guillotière" N45°45'08.45"/E4°50'08.45" included ancient buildings; and "Chapelle" N45°45'52.58/E4°47'24.28" included more recent buildings, a public garden ("Parc de la Tête d'Or" N45°46'26.93"/E4°44'04.06"), the waste incineration plant ("UIOM" N45°43'26.95"/E4°50'16.75") and a grassland in the suburb ("Francheville" N45°44'28.87/E 4°44'04.06"). The dwellings and public areas were selected based on the presence of high rat concentrations, as reported by the "Service d'Hygiène de Lyon" (i.e., the department of public health in Lyon). This study formed the basis of a larger project characterizing the distribution of zoonotic pathogens, including *Leptospira*, in rat populations conducted in the Rhône *département* (i.e., administrative sub-unit of France) [19]. For the purposes of this project, trapping locations were chosen based on population density to represent a range of urbanization levels. Only urban locations where *Leptospira* was detected were included in this study because the bacterial load in rats' kidneys was found to be appropriate for further molecular investigations.

Trapping occurred on both public and private properties, and permission to trap was obtained from the City and the property managers, respectively.

### **Sample collection**

Previous research has indicated that urban rats form tight colonies with a small home range, suggesting that a colony could be limited to a block [28-29]. Thus, we defined colonies to consist of rats inside geographical barriers, such as rivers, or urban infrastructures, including railways or blocks. Using this definition, the trapping locations were chosen to encompass not more than one colony. The survey was subdivided into a main trapping period, consisting of one 6-month period (October 2011 to March 2012), and a follow-up period, consisting of a 1-week period in January 2013 in which trapping was limited to the “Parc de la Tête d’Or” location. This extra week of trapping was performed to verify the consistency of the former results over time, and the location was chosen based on public health relevance (public garden) and high rat abundance. For the purposes of both pest control and this study, trapping/removal methods were used (snap trapping and live capture), with live capture being the preferred method to prevent post-mortem kidney contamination. Most rats were captured with small (28 cm x 9 cm x 9 cm) or large (50 cm x 15 cm x 15 cm) single-catch rat traps. The captured rats were transported to the laboratory, immediately anesthetized using isoflurane and sacrificed by cervical dislocation. For each animal, the weight, size, sex and level of sexual maturity (i.e., the presence of seminal vesicles in males and a developed uterus in females) were recorded. The rats that died during capture were frozen at -20°C and thawed on the day of dissection.

One kidney was removed and samples were taken for bacteriological culture immediately following collection, and one fourth of the other kidney, including the cortex and medulla, was stored at -80°C until further analysis.

### **Molecular investigations**

The flow chart of the molecular investigations is presented in Figure 1 and is detailed as follows.

#### ***Leptospira* isolation**

Half of one crushed kidney was aseptically transferred to tubes containing Ellinghausen McCullough Johnson and Harris (EMJH) culture media (Indicia, St Génis, France). Three dilution tubes were incubated at 29°C, according to a previously published protocol for the isolation of pathogenic *Leptospira* [30]. The tubes were examined weekly by dark-field microscopy for two months [15]. An additional month of culture examination was performed when PCR analysis yielded positive results (TaqMan real-time

PCR kit performed in parallel and detailed below) to increase the probability of detecting *Leptospira* growth.

DNA was extracted from 200 µl of each *Leptospira* culture using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. All DNA samples were stored at -20°C.

### **MST profile determination**

#### **DNA extraction and *Leptospira* detection in kidney tissue and urine**

One fourth of each kidney was homogenized aseptically using a syringe. A small amount of this crushed kidney (ca. 25 mg) or urine when available was incubated with 180 µl T1 Buffer and 25 µl proteinase K for 3 hours. After this protein digestion, DNA was extracted from 200 µl of lysed tissue using a Nucleospin Tissue kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) following the manufacturer's instructions. All DNA samples were stored at -20°C.

The extent of *Leptospira* colonization of the kidney was assessed using a specific pathogenic *Leptospira* TaqMan real-time PCR kit (TaqVet PathoLept kit, LSI, Lissieu, France) following the manufacturer's instructions. The appropriate negative control, consisting of the PCR mix without the target DNA, was included. The specimens with a cycle threshold (Ct) less than 45 cycles were considered positive.

When available, the DNA extraction and PCR technique was performed on urine samples as well.

### **Molecular typing**

The genotyping of *Leptospira* DNA was conducted using extracts from the isolate cultures and from the kidney samples. As the MST that we used was previously developed to discriminate between strains of the species *Leptospira interrogans*, the species was verified first, after which molecular typing was performed.

In the first step, the *rpoB* gene was amplified by PCR using HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) under standard conditions and the primers previously described [31]. A final volume of 50 µl, consisting of 35 µl H<sub>2</sub>O, 5 µl of 10× buffer (Qiagen), 2 µl of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl of 10 mM dNTPs (Qiagen), 1 µl of forward primer (10 µM), 1 µl of reverse primer (10 µM), 0.3 µl of HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) and 5 µl of target DNA, was amplified according to the following program: 15 min of enzyme activation at 95°C, followed by 40 cycles consisting of 95°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min and a final elongation step of 10 min at 72°C. The PCR products were sequenced using the BigDye Terminator

sequencing kit and a 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The *Leptospira* species in the samples were identified by analyzing these sequences using the NCBI nucleotide BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

In a second step, a multispacer sequence typing (MST) method developed for our survey and reported previously [26] was used to screen all culture-positive and PCR-positive samples. PCR amplifications were performed in a final volume of 50  $\mu$ l containing 35  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l of 10 $\times$  buffer (Qiagen), 2  $\mu$ l of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l of 10 mM dNTPs (Qiagen), 1  $\mu$ l of forward primer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l of reverse primer (10  $\mu$ M), 0.3  $\mu$ l of HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) and 5  $\mu$ l of target DNA. For samples with a low quantity of *Leptospira* DNA, the volume of the target DNA was increased to 8  $\mu$ l. The mix was amplified according to the following program: 15 min of enzyme activation at 95°C; followed by 40 cycles consisting of 95°C for 30 s, 50°C or 52°C, depending on the primer, for 30 s, and 72°C for 1 min; and a final elongation step of 10 min at 72°C. PCR mixes without the target DNA and with DNA from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni were used as appropriate negative and positive controls, respectively. The PCR products were sequenced using the BigDye Terminator sequencing kit with an Applied Biosystems 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The MST profile of the sequences was determined using the NCBI nucleotide BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### Statistical analysis

All statistical analyses were conducted using the R software, version 3.0.1 (R Development Core Team (2013), R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Morphometric characteristics were compared across the rat populations infected by different *Leptospira* strains. The data recorded for each rat included the species (determined by external morphology and macroscopic observations), sex, weight, size, and approximate age based on sexual maturity. A body mass metric was constructed from the residuals that resulted from the regression of weight on size [32]. To identify the characteristics associated with the carriage of each *Leptospira interrogans* strain, distributions of the explanatory variables were examined for the samples that included a given strain. Chi-squared tests or Fisher's exact tests were used when appropriate, and an alpha level of 0.05 was used to reject the null hypothesis. Statistical modelling was performed to evaluate the ability of specific rat-related criteria to act as predictors of the carriage of a given strain. Weight and size were transformed into normally

distributed variables when they were incorporated into the models. Simple logistic regression (SLR) was used to examine the relationships between two strains as the observed and explanatory variables. When a strain was observed in less than 5 rats, SLR was not used due to the low statistical power of the analysis. Covariates that were significantly associated with a given strain at an alpha level of 0.10 were considered for multivariate analysis, when appropriate. Then, the effects of one or more variables included in the final model were estimated with a generalized linear mixed model (GLMM), to control for the random effect of colonies and to account for the potential effects of clustering. The lme4 software package in R was used for this purpose, and the pseudo-R<sup>2</sup> was calculated to assess the effect of the random variable.

### **Spatial analysis**

Variations in the locations, infection status and strains of rats trapped across the study area were visualized spatially using the ArcGIS software, version 9.3 (ESRI, Redlands, CA, USA). This information was imported into the SaTScan software, version 9.3.1 (Boston, USA) for cluster analysis using a purely spatial Bernoulli model and scanning for areas with high frequencies of a given *Leptospira* strain using a circular window with a maximum spatial cluster size of 50% of the population at risk. Separate analyses were conducted for each *Leptospira* strain (n≥5) vs. rats that tested negative for that strain, including rats that tested negative for *Leptospira* spp. Clusters identified by SaTScan were visualized in ArcGIS.

The mean distance between colonies in which a given strain was identified was compared with the mean distance between colonies in which different strains were identified using Student's T test; an alpha value of 0.05 was used to identify significant differences.

## **RESULTS**

### ***Leptospira* spp. detection**

A total of 84 rats were trapped in the 8 locations, and all were Norway rats. The distributions of the rats trapped at each site and of PCR-positive samples are displayed in Table 1. *L. interrogans* was isolated from 24 rats, and *L. interrogans* DNA was extracted from 36 rats' kidneys. For one rat, a positive culture result was observed together with a negative PCR result. For another rat, *L. interrogans* DNA was detected in the urine, whereas it was not in the kidney tissue.

### ***Leptospira* MST profiles**

All 37 rats in which *L. interrogans* was detected were typed by MST, and MST profiles were determined in 35 samples; two MST profiles could not be identified due to low DNA concentrations. Four different MST profiles were identified and related to the serogroup Icterohaemorrhagiae and the serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni (strains are indicated in brackets). The most commonly observed MST-profile-related strain was Copenhageni [Wijnberg or M20] (n=26), followed by Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] (n=7), Icterohaemorrhagiae [R1] (n=1) and Copenhageni [Shibaura 9] (n=1). All of the MST profiles of the *Leptospira* isolates were similar to the MST profiles of the *Leptospira* DNA from the corresponding kidneys or urine.

### **Spatial analysis**

Figure 1 illustrates the distribution of rats infected with *L. interrogans* and shows the strains and locations of larger clusters of rats carrying a given strain. Interestingly, one strain was isolated in each colony. The colonies infected with *Leptospira* serovar Copenhageni [Wijnberg or M20] were most common (n=5); each of the three other strains was found in only one colony.

Two distinct clusters with a prevalence of a *Leptospira* strain that was higher than expected were identified: one of *Leptospira* serovar Copenhageni [Wijnberg or M20] and one of *Leptospira* serovar Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion]. The former included 3 locations ("Mermoz-B", "Mermoz-F" and "Mermoz-R") that were separated by less than 0.5 km. Two other colonies infected by *Leptospira* serovar Copenhageni [Wijnberg or M20] ("Francheville" and "Guillotière") were farther from the former locations, at 11.5 km and 4.5 km away, respectively. The latter cluster was located in "Parc de la Tête d'or" and was separated by 2.6 km to 10 km from the other locations. The mean distance between colonies where *Leptospira* Copenhageni [Wijnberg or M20] circulated was  $5.5 \pm 4.82$  km and was not significantly different from the mean distance between colonies that contained different strains, which was  $6.88 \pm 1.84$  km ( $t = -0.8$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0.44$ ).

### **Temporal investigation**

In the two infected rats trapped in the second period in the "Parc de la Tête d'Or", the serovar Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] was identified from the MST profiles. The serovar detected in this period was the same as the serovar detected in the same location one year previously.



## Statistical analysis

The characteristics of the rats infected with Copenhageni [Wijinberg or M20] versus Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] were compared (Table 2), and the latter served as the reference strain. The relative proportions of juvenile (sexually immature) and adult (sexually mature) rats carrying Copenhageni [Wijinberg or M20] and Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] could not be determined because no sexually immature rats carrying Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] were trapped. Differences between the distributions of males and females by infection status were examined using Fisher's exact test (OR=1.5, 95% CI=0.2–19,  $p=0.99$ ); for each strain, the distributions of males and females were not significantly different. The OR of carrying Icterohaemorrhagiae [Wijinberg or M20] was significantly lower in heavier and longer rats (OR<sub>weight</sub>=0.17, 95% CI=0.05–0.55 and OR<sub>size</sub>=0.06, 95% CI=0.01–0.44, respectively). After controlling for the clustering of colonies using GLMMs, the ORs were not significantly different from 1. The estimated variance for the random effect of colonies was predominant in the total residual variance ( $R_{\text{weight}}^2=0.9041$ ,  $R_{\text{size}}^2=0.9043$ ). Finally, body condition did not vary significantly with rat infection status (OR=0.98, 95% CI=0.97–0.99,  $p=0.097$ ).

## DISCUSSION

This study demonstrated that urban rats carry a variety of *L. interrogans* strains, all with MST profiles that were previously identified in humans. More specifically, four distinct MST profiles were identified in the rat population in this study, and a single MST profile was attributed to each rat colony. These outcomes raised methodological, epidemiological and public health issues.

### Use of MST to distinguish *Leptospira* strains in rat surveys

The tests used for screening wildlife species have typically been developed for humans or domestic species and have not been validated in wild species, such as wild rats. A positive culture and PCR-negative result were observed in one rat, as well as PCR-positive urine and a PCR-negative kidney. These results emphasized the importance of multiplying samples and tests to increase the sensitivity of the survey.

As a first step, *Leptospira* were detected by isolation and molecular analyses. The recovery of bacteria from an individual kidney by bacteriological culture was considered to be definitively diagnostic of *L. interrogans* infection and was considered to be appropriate for early detection because

kidney colonization occurs during the first week of *Leptospira* infection [33]. However, this culturing method is slow and insensitive, and the frequency with which bacteria are isolated is typically low. Thus, qPCR was also performed because it is reportedly the most sensitive method of detection for human *Leptospira* [34]. However, false negatives can still be obtained if PCR is used to identify uncharacterized pathogenic strains [35] or if the bacteria have aggregated in an unsampled part of the kidney. Thus, a combination of culturing and qPCR analyses on a variety of sample types was performed in an attempt to increase detection sensitivity. For instance, one rat that was PCR-positive in the urine and PCR-negative in the kidney would have been missed without this combination of tests.

As a second step, *Leptospira* DNA from 37 rats was genotyped. The MST profiles were not fully obtained for two rats that tested positive for *L. interrogans* because the DNA load, characterized by the cycle threshold (Ct), was lower in these samples (LYO0845, Ct=38.67 and LYO0881, Ct=38.72), compared to other samples (Ct≤35). Because the MST method is less sensitive than real-time PCR, the MST method cannot be used alone for screening purposes. The use of serial testing, consisting of culture and/or qPCR combined with MST, can be expected to provide a reliable reflection of *Leptospira* infection and of the *Leptospira* strains circulating in rat colonies.

The sensitivities of MST and VNTR in rat samples appeared to be similar; however, for the identification of *Leptospira* strains, MST was more specific and more robust than VNTR because it is based on sequencing (Zilber *et al.* 2014). Additionally, the robustness of MST was highlighted by the consistency with which it could identify strains in various samples (*e.g.*, isolates or *Leptospira* DNA from the kidney or urine) from the same rat. This finding suggested that *Leptospira* DNA extracted from rat samples could be sufficient for MST use, which is appropriate for the purposes of epidemiological surveys.

### **Implications for the epidemiology of *Leptospira***

Although the carriage of Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] appeared to be associated with greater weight and size, the OR values for infection with this strain were likely overestimated because of the morphometry of the source population. As shown by an analysis using the mixed model, the influence of the location of the colony had a greater effect on the status of infection with Icterohaemorrhagiae than did rat covariates. Indeed, the weights and sizes were higher (data not shown) in the rats caught from “Parc de la Tête d’or”, compared to the weights and sizes of rats collected

from other locations. It is possible that these unbalanced source populations might have introduced selection bias into the analysis. However, no evidence of associations between rat features and strain status (Copenhageni [Wijnberg or M20] vs. Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion]) was found by the statistical analysis. In addition, the small numbers of rats in some categories and that data on Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion]-infected rats were obtained for only one colony could have influenced the results. The small sample size of PCR-positive rats when split across several sampling sites was not sufficient to detect significant correlations with subtle morphometric variables; therefore, larger sampling sizes are required to confirm whether the persistence of a given strain is related to intrinsic characteristics of the rat population. Although individual variation in the susceptibility to infection is a common outcome of epidemiological studies, this result was not necessarily expected when comparing rat features between strains. The ability of MST to distinguish among strains is based on a comparison of the nucleotide sequences of several intergenic regions; consequently, different frequencies of identification of strains by MST cannot be interpreted as resulting from different levels of infectiousness in hosts.

Spatial analysis suggests that a single strain was found in each colony. In the two spatial clusters identified, the probabilities of finding Copenhageni [Wijnberg or M20] and Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion], respectively, in rats were significantly higher than the probabilities of finding other strains. Although the results of the spatial analysis were not statistically significant in other colonies, most likely due to limited data, only one strain was observed in each colony. The Copenhageni [Wijnberg or M20] strain was found most frequently in rats and was isolated in 5 colonies 0.5 km to 11.5 km apart from each other. It cannot be determined whether this specific geographical pattern resulted from the dispersal of individual rats and rat-to-rat transmission or from exposure to a non-rat source, such as the environment within a given colony, or both. As colonies infected with the same strain are not significantly closer to each other than are colonies infected with different strains, a dispersal of individuals resulting in admixed strains would have been expected; however, such a pattern was not observed in this study. Based on the assumption that a single strain was associated with each colony, it is likely that few contacts occur between colonies, which is consistent with previous studies of the genetic characteristics of urban rats [36]. Moreover, high degrees of habitat fragmentation in urban areas should also limit individual rat movement between areas and result in the geographical isolation of urban rat

populations [27]. The absence of cross-contamination between colonies strongly supports this hypothesis. Thus, Copenhageni [Wijnberg or M20] infections in rats from remote colonies may be related to rare and ancient rat movements between colonies, as has been described previously using population genetics [37]. Interestingly, the environment associated with the 5 sites varied considerably (low-income dwelling, old dwellings, public garden in the suburb), suggesting that a variety of habitats may be associated with the same strain.

Although follow-up observations were limited to one location, the fact that the same strain was isolated in the same location one year later suggests that the isolated *Leptospira* strain persist over time within the same colony and supports the hypothesis that there is limited interaction between colonies. Therefore, the strain Copenhageni [Wijnberg or M20] encountered in remote locations may have been there for a substantial amount of time.

One potential method for testing the distributions of strains over space and time would be to tag rats and monitor their movements. Such protocols have been used before in rural or island habitats, although they are less appropriate for urban wild rats, mainly due to the adverse effects of human activities on capture success (e.g., pest control measures and trap deterioration). Thus, our original findings aid in the estimation of temporal stability and spatial connectivity of populations, increasing our knowledge of the epidemiology of this disease, which will be crucial for the development of prevention methods.

### **Implications for public health**

This study distinguished among four MST profiles related to four strains from the serogroup Icterohaemorrhagiae. As an MST profile is only a partial typing of the entire leptospiral genome, two identical MST profiles are not necessarily evidence of two identical strains; however, two identical MST profiles strongly suggest that the strains are closely related. Nevertheless, the method was validated for *L. interrogans* and cannot be applied to other *Leptospira* species. As the rat is the primary carrier of *L. interrogans*, these findings are of limited importance for wild rat survey purposes. This new MST method is relevant to public health because, in France, Icterohaemorrhagiae is the main serogroup reported in humans, and this serogroup primarily belongs to the species *L. interrogans* [11;38]. Additionally, the strains identified in this study were previously described in humans [27], suggesting that, depending on the exposure context, these humans were likely infected by rats. However, many reservoir hosts for

leptospirosis exist, and to determine whether rats are the source of human disease, an inventory of strains among the varied hosts species and humans is required. In this context, the MST approach could be used for the purpose of source tracing.

Our finding that all of the strains belonged to the serogroup Icterohaemorrhagiae supported the use of the current vaccine available for humans in France, which includes the serovar Icterohaemorrhagiae (Spirolept®). By distinguishing *Leptospira* strains, MST could identify further strains of interest for public health and could aid in the designing of future vaccines.

MST has previously helped to define phylogeographical lineages of mycobacteria [39]. As the present study suggests that only one strain may be assigned to a colony home range, the areas in which individual strains are distributed are expected to be well delimited without overlapping. Among the numerous colonies that exist in Lyon, the eight colonies in this study provide a restricted overview of currently circulating strains; with more sampling, it would be possible to determine whether additional strains circulate and to provide a more complete picture of their spatial distributions. Maps of the spatial distribution of *Leptospira* strains would be of great interest in epidemiologic investigations. This knowledge would help to locate the potential sources of infection. Together with surveillance of MST outcomes in rats, an updated map of strain distributions would permit early detection of emerging strains. Strain emergence or re-emergence in a given area is likely to occur due to changing environments, host population fluctuations and vaccine pressure. Detecting such a change would facilitate appropriate leptospirosis preparedness efforts and would be useful in preparing for natural disasters, such as storms, hurricanes and particularly flooding, all of which are usually associated with an increased incidence of human and animal leptospirosis [40-41].

## CONCLUSIONS

The application of MST allowed for the accurate characterization of *Leptospira interrogans* strains and DNA in rats. Our study demonstrates the effectiveness of MST for epidemiological surveillance of *L. interrogans* in rat colonies and offers novel perspectives on *Leptospira* epidemiology. In the future, large-scale *Leptospira* genotyping using MST could provide substantial knowledge of leptospirosis in various host populations and habitats. This approach could generate valuable information that could be

used to generate a phylogeographical database to improve epidemiological investigations and to track the sources of this disease in a particular epidemiological catchment area. Early detection of emergent strains or changes in the strain distribution using MST could drive future public health efforts.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the city of Lyon and its public health department (Dr. Gilbert Gault), the waste plant UIOM de Lyon (Mr. Joël Baud) and the Parc de la Tête d'Or (Drs. David Gomis and Guillaume Douay, managers) for assisting with rat and census data collection. We thank Philippe Berny and Joffrey Goulois for assisting with rat collections.

## **FINANCIAL SUPPORT**

This project was supported by USC 1233 and by WildTech Project WP6, Epidemiology and Risk Assessment, which is supported by the European Commission under the Food, Agriculture and Fisheries and Biotechnology theme of the Seventh Framework Programme for Research and Technological Development (grant number 222633).

## **CONFLICTS OF INTEREST**

None.

## **REFERENCES**

1. Abela-Ridder B, Sikkema R, Hartskeerl RA (2010) Estimating the burden of human leptospirosis. *Int J Antimicrob Agents* 36 Suppl 1: S5–7. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.012
2. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA (2011) Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect* 17: 494–501. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x
3. Guerra MA. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc*. 2009 Feb 15;234(4):472-8, 430. doi: 10.2460/javma.234.4.472. Review.
4. Bharti AR, *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases* 2003; 3: 757-771.

5. Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology* 2009; **35**: 221-270.
6. Levett PN, 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14:296-326.
7. Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med.* 1996 Nov 15;125(10):794-8.
8. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Oct;7(10):736-47. doi: 10.1038/nrmicro2208.
9. Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 2010 Sep;5(9):1413-25. doi: 10.2217/fmb.10.102. Review.
10. Socolovschi C, Angelakis E, Renvoisé A, Fournier PE, Marié JL, Davoust B, Stein A, Raoult D. Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int J Infect Dis.* 2011 Oct;15(10):e710-5. doi: 10.1016/j.ijid.2011.05.017.
11. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010 Jan 27;140(3-4):287-96. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.012. Epub 2009 Mar 13.
12. Cerqueira GM, Picardeau M, 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 9:760-768.
13. Bourhy P, Collet L, Brisse S, Picardeau M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 Dec;64(Pt 12):4061-7. doi: 10.1099/ijs.0.066597-0.
14. Kmety E, Dikken H: Classification of the Species *Leptospira interrogans* and the History of Its Serovars. A History of the Publication of the Serovars of Leptospirae, and a Catalogue of their Relationships. University Press Groningen, Groningen, the Netherlands; 1993.
15. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 2013 Jan; 43(1):1-9. doi: 10.1016/j.medmal.2012.11.005. Epub 2013 Jan 18.
16. Easterbrook JD, *et al.* A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiology and Infection* 2007; **135**: 1192–1199.
17. Krøjgaard LH1, Villumsen S, Markussen MD, Jensen JS, Leirs H, Heiberg AC. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect.* 2009 Nov;137(11):1586-92. doi: 10.1017/S0950268809002647. Epub 2009 Apr 27.

18. Himsworth CG, *et al.* Ecology of *Leptospira interrogans* in Norway rats (*Rattus norvegicus*) in an inner-city neighborhood of Vancouver, Canada. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013; 7: e2270.
19. Ayral F, Artois J, Zilber AL, Widén F, Pounder KC, Aubert D, Bicout DJ, Artois M. The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010-2012). *Epidemiol Infect.* 2014 May 16:1-14.
20. Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Sohmura Y, Hayashi E, Akao N, Hoshino M, Kawabata H, Watanabe H. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *J Med Microbiol.* 2009 Sep 58:1227-30. doi: 10.1099/jmm.0.011528-0. Epub 2009 Jun 15.
21. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Mansotte F, Brasme L, De Champs C, Bolut P, Mondot P, Faliu J, Rochereau S, Kodjo A, Andre-Fontaine G. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009 Nov 32:463-76. doi: 10.1016/j.cimid.2008.05.004. Epub 2008 Jul 18.
22. EFSA. Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications) *EFSA Journal* 2013;11(12):3502 [84 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2013.3502
23. Li S, Wang D, Zhang C, Wei X, Tian K, Li X, Nie Y, Liu Y, Yao G, Zhou J, Tang G, Jiang X, Yan J. Source tracking of human leptospirosis: serotyping and genotyping of *Leptospira* isolated from rodents in the epidemic area of Guizhou province, China. *BMC Microbiol.* 2013 Apr 1;13:75. doi: 10.1186/1471-2180-13-75.
24. Bourhy P1, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Brémont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2114. doi: 10.1371/journal.pntd.0002114. Epub 2013 Mar 14.
25. Villanueva SY, Saito M, Baterna RA, Estrada CA, Rivera AK, Dato MC, Zamora PR, Segawa T, Cavinta LL, Fukui T, Masuzawa T, Yanagihara Y, Gloriani NG, Yoshida SI. *Leptospira*-rat-human relationship in Luzon, Philippines. *Microbes Infect.* 2014 Jul 15. pii: S1286-4579(14)00087-2. doi: 10.1016/j.micinf.2014.07.001.



26. Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, Tatard C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, Buchy P, Jittapalapong S, Herbreteau V, Morand S. Epidemiology of leptospira transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jun 5;8(6):e2902. doi: 10.1371/journal.pntd.0002902. eCollection 2014.
27. Zilber AL, Picardeau M, Ayral F, Artois M, Demont P, Kodjo A, Djelouadji Z. High-resolution typing of *Leptospira interrogans* strains by multispacer sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2014 Feb;52(2):564-71. doi: 10.1128/JCM.02482-13.
28. Feng AYT, Himsworth C (2013) The secret life of the city rats: a review of ecology of urban Norway and black rats (*Rattus norvegicus* and *rattus rattus*) Urban ecosyst DOI 10.1007/s11252-013-0305-4
29. Davis D E., Emlen J T., and Stokes A W. Studies on Home Range in the Brown Rat *Journal of Mammalogy* Vol. 29, No. 3 (Aug., 1948), pp. 207-225
30. Zuerner RL. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Current Protocols in Microbiology* 2005; Chapter 12: Unit 12E.1.
31. La scola B. et al, 2006, Partial *rpoB* gene sequencing for identification of leptospira species, *FEMS Microbiol Lett*
32. Sokal RR, Rohlf FS. *Biometry*. New York: WH Freeman, 1981.
33. Athanazio DA, et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonisation by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropica* 2008; 105: 176-180.
34. Bourhy P, et al. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira spp.* in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49: 2154-2160.
35. Bourhy P, et al. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira spp.* in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 49: 2154-2160
36. Gardner-Santana LC, Norris DE, Fornadel CM, Hinson ER, Klein SL, Glass GE. Commensal ecology, urban landscapes, and their influence on the genetic characteristics of city-dwelling Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Molecular Ecology* (2009) 18, 2766-2778
37. Kajdacs B1, Costa F, Hyseni C, Porter F, Brown J, Rodrigues G, Farias H, Reis MG, Childs JE, Ko AI, Caccone A. Urban population genetics of slum-dwelling rats (*Rattus norvegicus*) in Salvador, Brazil. *Mol Ecol*. 2013 Oct;22(20):5056-70. doi: 10.1111/mec.12455. Epub 2013 Sep 30.
38. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Volume 43, Issue 1, January 2013, Pages 1–9

39. Djelouadji Z1, Arnold C, Gharbia S, Raoult D, Drancourt M. Multispacer sequence typing for Mycobacterium tuberculosis genotyping. PLoS One. 2008 Jun 18;3(6):e2433. doi: 10.1371/journal.pone.0002433.
40. Watson JT, Gayer M, and Connolly MA. Emerg Infect Dis. Jan 2007; 13: 1–5
41. Carlos Pereira, Martha Barata, and Aline Trigo, Int. J. Environ. Res. Public Health 2014, 11, 4140-4157

**Table 1 – Distribution of rats testing positive among the trapping locations and nature (species, serogroup [Sg], serovar [Sv] and strain) of *Leptospira* based on multispacer sequence typing profiles.**

	No. of rats captured	No. of PCR <sup>a</sup> -positive kidneys	No of PCR <sup>a</sup> -positive urine (no. performed)	No. of culture-positive kidneys	Total infected rats	<i>L. interrogans</i> species (by sequencing)	No. of complete MST profiles	<i>L. strain</i> related to MST profile		
								Sg	Sv	Strain
Francheville	9	1		1	1	1	1	IH	cop	M20 or Wijnberg
Guillotière	3	2		0	2	2	2	IH	cop	M20 or Wijnberg
la chapelle	1	0		1	1	1	1	IH	ict	R1
Mermoz sud_B	13	9	2 (3)	9	9	9	9	IH	cop	M20 or Wijnberg
Mermoz sud_F	17	12		6	12	12	11	IH	cop	M20 or Wijnberg
Mermoz sud_R	7	2	1(2)	2	3	3	3	IH	cop	M20 or Wijnberg
PTO	8	5	1(1)	3	5	5	5	IH	ict	CHU Réunion
PTO*	3	2		2	2	2	2	IH	ict	CHU Réunion
UIOM	23	2	0(1)	0	2	1	1	IH	cop	Shibaura 9
Total	84	36	4(7)	24	37	36	35			

<sup>a</sup> PCR using *rpoB* primer

\*second trapping period for the strain followed up in the Parc de la Tête d'Or

IH, Icterohaemorrhagiae; cop, Copenhageni; ict, icterohaemorrhagiae; PTO, "Parc de la Tête d'Or"

**Table 2 – Morphometric characteristics of a population of wild Norway rats with different multispacer sequence typing profiles and statistical comparisons of their distributions between the serovars [strains] Copenhageni [Wijnberg/M20] and Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion], with the latter being the reference strain.**

Leptospira strains						Statistical analysis			
	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	Fisher's Exact Test	p-value	SLR	p-value	
	[M20/Wijnberg]	[CHU Réunion]	[Shibaura 9]	[R1]	OR		OR		
	(n=26)	(n=7)	(n=1)	(n=1)	[95% CI]		[95% CI]		
Characteristic									
Sex									
	Female	10	2	0	0	-			
	Male	16	5	1	1	1.5	0.99		
						[0.2 -19]			
Sexual maturity									
	Immature	1	0	0	0	-			
	mature	25	7	1	1	a			
Weight (g)									
	Median	244.3	387.0	374	267		0.17	0.0131	
	(IQR)	(204.8-287.0)	(273.5-431.0)	(- <sup>a</sup> )	(- <sup>a</sup> )		[0.05-0.55]		
Length (cm)									
	Median	22.7	25	24.5	23.3		0.06	0.0203	
	(IQR)	(22.0-23.9)	(23.5-26.7)	(- <sup>a</sup> )	(- <sup>a</sup> )		[0.01-0.44]		
Body condition									
	-	-	-	-			0.98	0.0976	
							[0.97 -0.99]		

<sup>a</sup> insufficient number of rats to estimate the interquartile range (IQR)

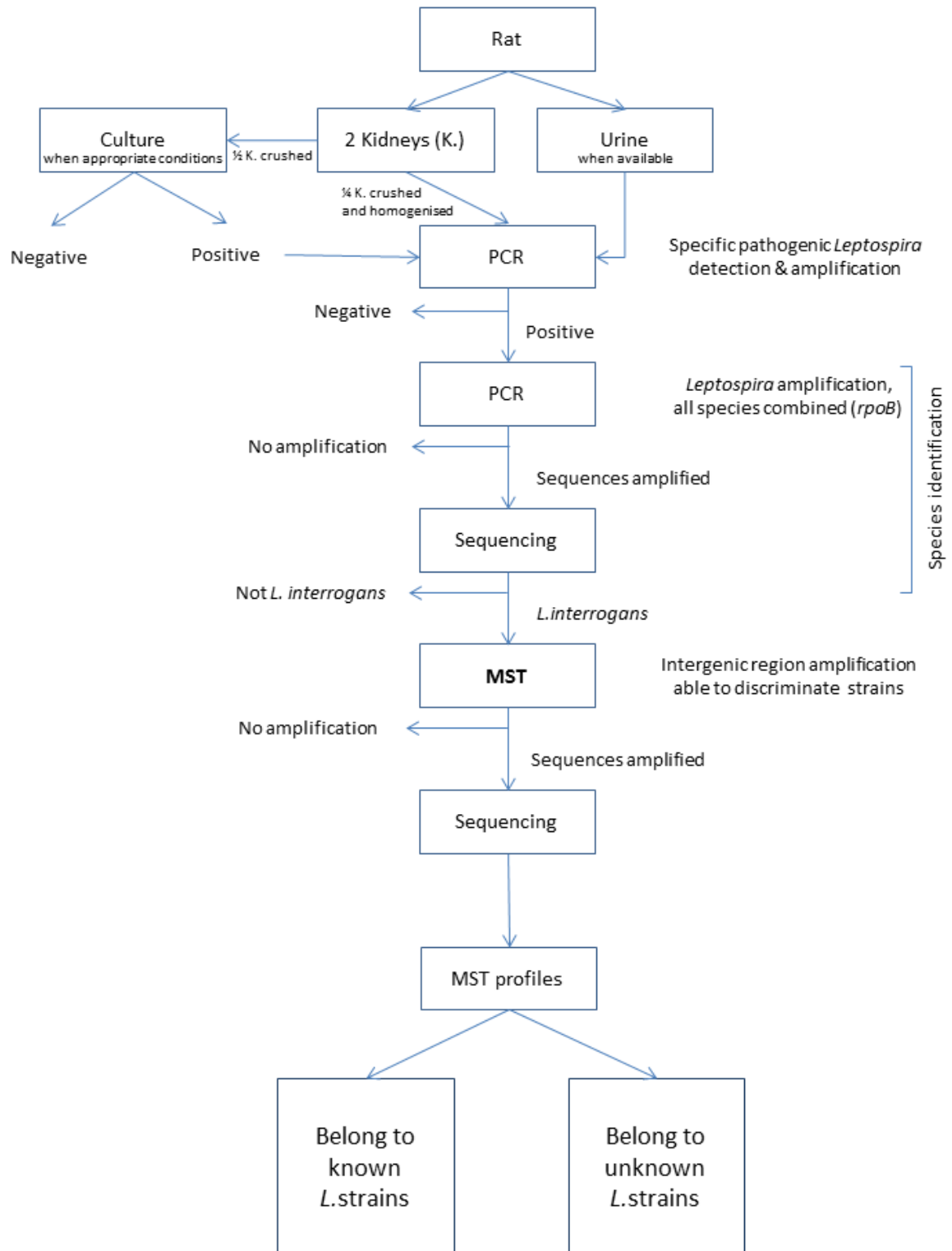
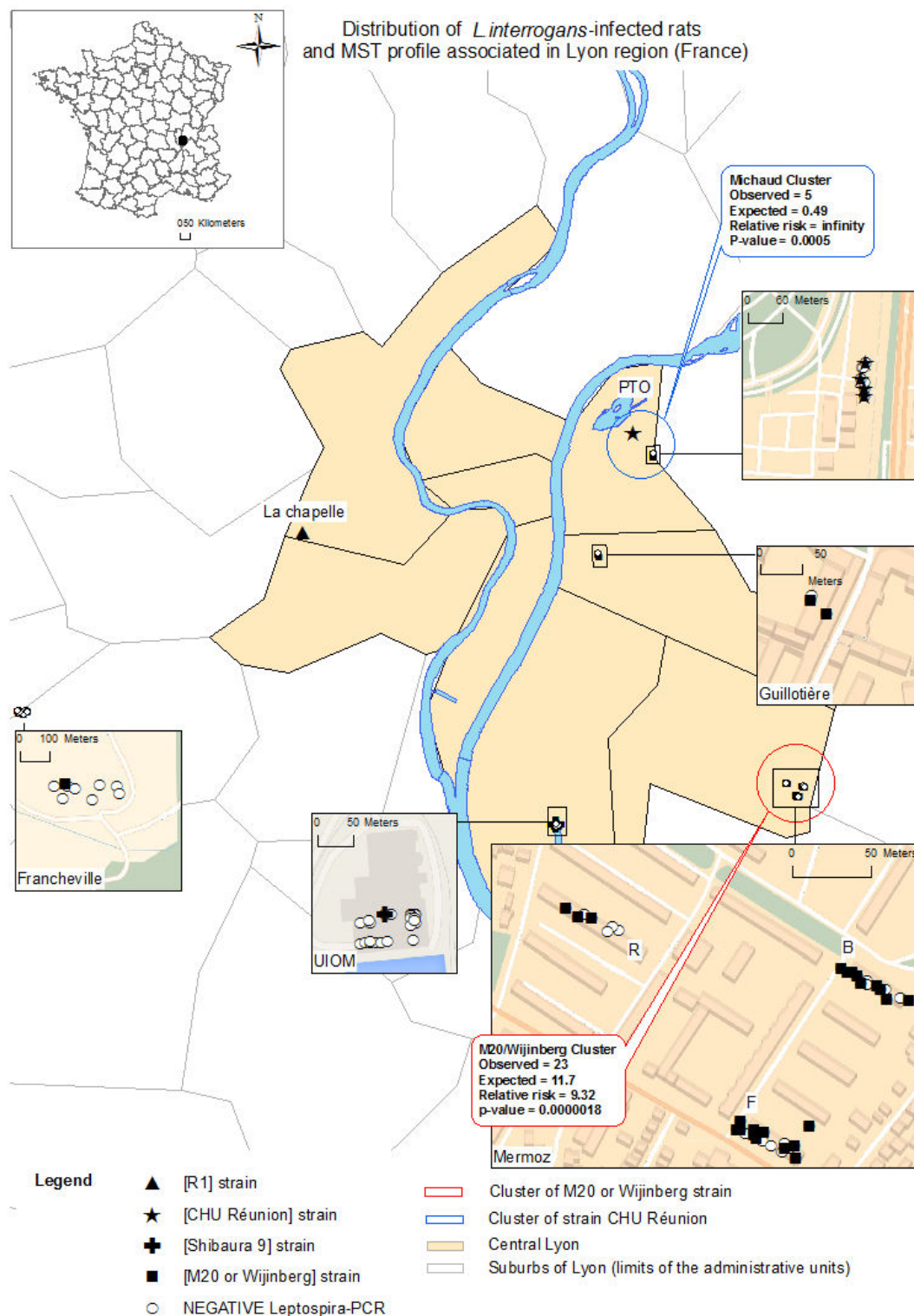


Figure 1 – Flow chart of the molecular methods performed to determine *Leptospira* strains.



**Figure 2 – Geographic distribution of *L. interrogans* MST profiles detected in wild Norway rats from downtown Lyon and a suburb.**

## 5.2. Dynamique de persistance de *L. interrogans* parmi les rats

### 5.2.1. Introduction

La structure de la population de rat joue un rôle dans le cycle des ZAR et le risque d'exposition de l'Homme (Davis *et al.*, 2005; Himsworth *et al.*, 2013a). Par conséquent, les facteurs extrinsèques tels que les campagnes de capture ou d'empoisonnement peuvent avoir un impact sanitaire (variation de la prévalence d'infections) en modifiant la structure et la dynamique de la population. Pour certaines infections de la faune sauvage, le contrôle de la population basé sur l'élimination des animaux peut entraîner une augmentation de la prévalence en altérant l'équilibre écologique de la population alors en faveur de la transmission (Bolzoni *et al.*, 2007). Les interventions de l'homme sur les populations de rats pourraient avoir les mêmes conséquences. Par exemple, les précédentes épidémies de peste ont montré qu'une mortalité importante chez les rats était suivie d'une augmentation de cas humains (Boisier *et al.*, 2002; Chanteau *et al.*, 1998; Keeling et Gilligan, 2000; Monecke *et al.*, 2009). De fait, *Xenopsylla cheopsis* (vecteur principal de la peste) se nourrit préférentiellement sur les rats mais à défaut, lorsque la population s'éteint, se nourrit sur l'Homme (Monecke *et al.*, 2009). L'élimination des rats lors d'une épidémie de peste augmenterait donc l'incidence de la maladie chez l'Homme par défaut de l'hôte préférentiel de la puce (Keeling et Gilligan, 2000; Monecke *et al.*, 2009).

La distribution hétérogène du portage de leptospires pathogènes parmi les rats est décrite malgré la proximité entre les colonies (*cf.* Chapitre 4). Nos précédents travaux (*cf.* §5.1) suggèrent l'absence de transmission d'une colonie à l'autre et ouvre le questionnement sur les mécanismes de persistance intra colonie. L'environnement peut-il agir sur la transmission intra colonie et être déterminant dans l'hétérogénéité observée de la prévalence ? Les modèles mathématiques pourraient fournir une meilleure compréhension de la dynamique de transmission des leptospires intra-populations. Cependant, face au manque de connaissance notamment sur la place relative des voies de transmission directe (sexuelle, verticale, contact direct avec muqueuse ou peau abrasée) et indirecte (contact entre muqueuse ou peau abrasée et environnement contaminé), la conception d'un modèle de persistance des leptospires chez

les rats est complexe. Cette raison est probablement responsable du peu de modèles disponibles à ce jour chez les rongeurs (Leirs *et al.*, 1994, 1997) et de leur totale absence de la littérature concernant les rats.

L'objectif de cette partie était de synthétiser les connaissances et proposer une approche pour modéliser la persistance des leptospires dans une population de rats. La question d'intérêt était l'effet de l'environnement (rural *vs* urbain). Le modèle est un système d'équations différentielles représentant à la fois la variation de l'effectif de la population et la variation du nombre de rats infectés par *L. interrogans*. L'effectif de la population de rats est issu du modèle de dynamique de population développé pour les objectifs du modèle de persistance.

### 5.2.2. Dynamique des populations de rats<sup>3</sup>

#### Matériels et Méthodes

La dynamique des populations de rat est décrite suivant le modèle de croissance logistique des populations (Modèle de Verhulst-Pearl-Reed; Emlen *et al.*, 1948).

La population de rongeur est divisée en deux classes d'âge (juvéniles *vs* adultes) pour tenir compte du comportement (*e.g.* contacts agressifs, exploration de l'environnement chez l'adulte) qui influe sur l'exposition aux leptospires. Les juvéniles sont les rats de la naissance à la maturité sexuelle (3 à 4 mois d'âge, «  $T_1$  ») alors que les adultes sont définis tels que des rats sexuellement matures. Le nombre de juvéniles dépend du taux de mortalité ( $\mu_1$ ), supposé constant et de la fécondité des femelles adultes ( $F(t)$ ) définie comme le nombre de rats par portée en fonction du temps. Le nombre d'adulte est densité dépendant, une capacité de portage est donc définie pour éviter à la population d'atteindre un effectif irréaliste. Une variable «  $A_{max}$  » a donc été définie comme la capacité d'accueil, la valeur seuil du nombre

---

<sup>3</sup> Travaux menés en collaboration avec Kévin Julien Saint Amand dans le cadre de son stage de Master 1 dans l'équipe EPSP



d'adultes au-delà duquel la mortalité ( $\mu_2$ ) augmente. Les équations déterminant le nombre de juvéniles et d'adultes sont écrites comme suit,

$$\begin{aligned}\frac{dJ}{dt} &= F(t) - s_1 F(t - T_1) - \mu_1 J \\ \frac{dA}{dt} &= s_1 F(t - T_1) - \mu_2 \left(1 + \frac{A}{A_{max}}\right) A\end{aligned}\quad , \quad \text{Eq. 1}$$

avec  $s_1 = e^{-\mu_1 * T_1}$ .

L'effet de la saison sur le taux de fécondité des rongeurs a été rapporté dans les zones tropicales (Leirs *et al.*, 1994; Massawe *et al.*, 2011). En Europe de l'ouest (*i.e.* Royaume-Uni), une fécondité accrue (proportion de juvéniles et de femelles gestantes ou en lactation) est décrite de novembre à décembre et de mars à avril (Butler et Whelan, 1994; Russell et Ruffino, 2012), et peut être caractériser par une durée de deux mois ( $T_2$ ) suivant une période de pluie plus importante. L'effet de la saison sur les populations est commune à de nombreuses espèces, le mécanisme n'est cependant pas clair et influencerait directement ou indirectement sur la fécondité. Modéliser la fécondité à partir de la saisonnalité ou de variables météorologiques est donc hasardeux dans le contexte des connaissances disponibles. Dans un but de simplification, la saisonnalité a été traduite par la variation de l'amplitude de la fécondité à un intervalle régulier et incluait la survie des adultes ( $r_m$ ) de « $t$ » à la portée suivante « $m$ » comme suit,

$$F(t) = \mu_2 \sum_{m=1}^{\infty} f_m r_m(t|t - mT_2) A(t - mT_2), \quad \text{Eq. 2}$$

$$\begin{aligned}r_m(t|t - mT_2) &= \prod_{n=1}^m s(t - (n - 1)T_2|t - nT_2) \\ \text{avec } s(t|t_0) &= \frac{e^{-\mu_1 * (t - t_0)}}{1 + \left(\frac{A(t_0)}{A_{max}}\right) [1 - e^{-\mu_1 * (t - t_0)}]}\end{aligned}\quad , \quad \text{Eq. 3}$$

L'accès à la nourriture n'a pas été considéré dans ce modèle puisque les ressources ne sont pas limitées tant en milieu urbain (*e.g.* déchets) qu'en milieu rural (*e.g.* aliments du bétail) où les rats sont localisés à proximité de fermes.

La population de rats était définie par son taux de reproduction de base ( $Q_0$ ) qui est le nombre moyen d'adultes qu'une femelle engendrerait durant sa vie et en absence de facteurs limitants.

Les nombres de juvéniles et d'adultes une fois que la population a atteint son effectif stationnaire sont définis par ( $J_s$ ) et ( $A_s$ ) respectivement.  $Q_0$ ,  $J_s$  et  $A_s$  sont définis comme suit,

$$Q_0 = f * s_1 \sum_{m=1}^{\infty} s_2^m = \frac{f * s_1 * s_2}{1 - s_2}, \quad \text{Eq. 4}$$

$$\text{avec } s_2 = e^{-\mu_2 * T_2}$$

$$\frac{J_s}{A_s} = \left( \frac{\mu_2}{\mu_1} \right) \left( \frac{1 - s_1}{s_1} \right) \sqrt{Q_0}, \quad \text{Eq. 5}$$

$$A_s = K = (\sqrt{Q_0} - 1) A_{max}$$

Les valeurs des paramètres du modèle sont décrites dans la table 14. Ils ont été incorporés dans le modèle afin de simuler la dynamique de population.

**Table 14 – Valeurs des paramètres inclus dans le modèle de dynamique des populations**

Paramètres	Symboles	Valeurs	Unités	Références
Mortalité des jeunes	$\mu_1$	0.8	jour <sup>-1</sup>	hypothèse
Durée de vie	$1/\mu_2$	548	jour	Jackson, 1982
Amplitude de la fécondité:	$fmin; fmax$		Rat/portée	hypothèses
Urbain	-	8 ; 12	-	-
Rural	-	4 ; 16	-	-
Délai de maturation des jeunes	$T_1$	90	jour	4
Intervalle entre 2 portées	$T_2$	60	jour	3
Seuil d'augmentation du taux de mortalité chez les adultes:	$A_{max}$		Nombre de rat	
Urbain	-	50	-	5
Rural	-	200	-	hypothèse

L'ensemble de ces facteurs a été intégré dans un système d'équations (*cf.* Annexe 19) et programmé dans R (version 3.0) afin d'obtenir les courbes de variation des populations en fonction du temps. Relativement à la population murine urbaine, la population établie en milieu rural était caractérisée par une plus faible contrainte d'espace, traduite par un  $A_{max}$

<sup>4</sup> <http://www.ratbehavior.org/Stats.htm> consulté le 21/01/2015

<sup>5</sup> Hypothèse fondée à partir d'une densité maximale de 0,2 rats/m<sup>2</sup> (Emlen *et al.*, 1958)

plus élevé et une plus forte contrainte climatique, traduite par une amplitude de la fécondité plus large.

## **Résultats et discussions**

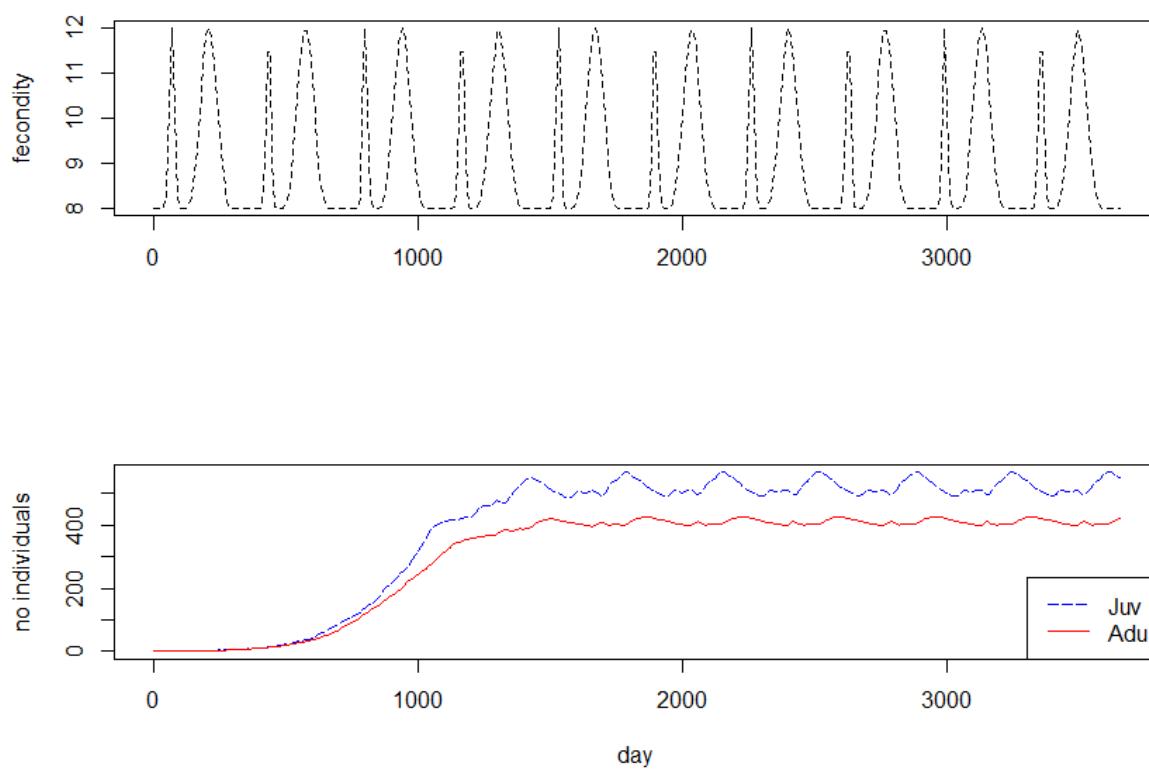
D'après les figures 10 et 11, les populations urbaines et rurales diffèrent essentiellement par l'effectif de la population au stade d'équilibre (de l'ordre de 400 individus *vs* 1500 individus respectivement), le délai d'atteinte de la population d'équilibre (1000 jours *vs* 1500 jours respectivement) et l'amplitude de fluctuation populationnelle, moindre en milieu urbain.

Le milieu rural est caractérisé par une capacité d'accueil réduite liée aux contraintes spatiales imposées par les infrastructures urbaines. Le Amax des milieux urbain et rural diffère d'un facteur de 4. Cette valeur, choisie arbitrairement, reflète les contraintes des milieux cependant des études de terrain visant à déterminer l'effectif maximum des populations sauvages et leur domaine vital dans les différents milieux permettraient une modélisation plus réaliste de la dynamique.

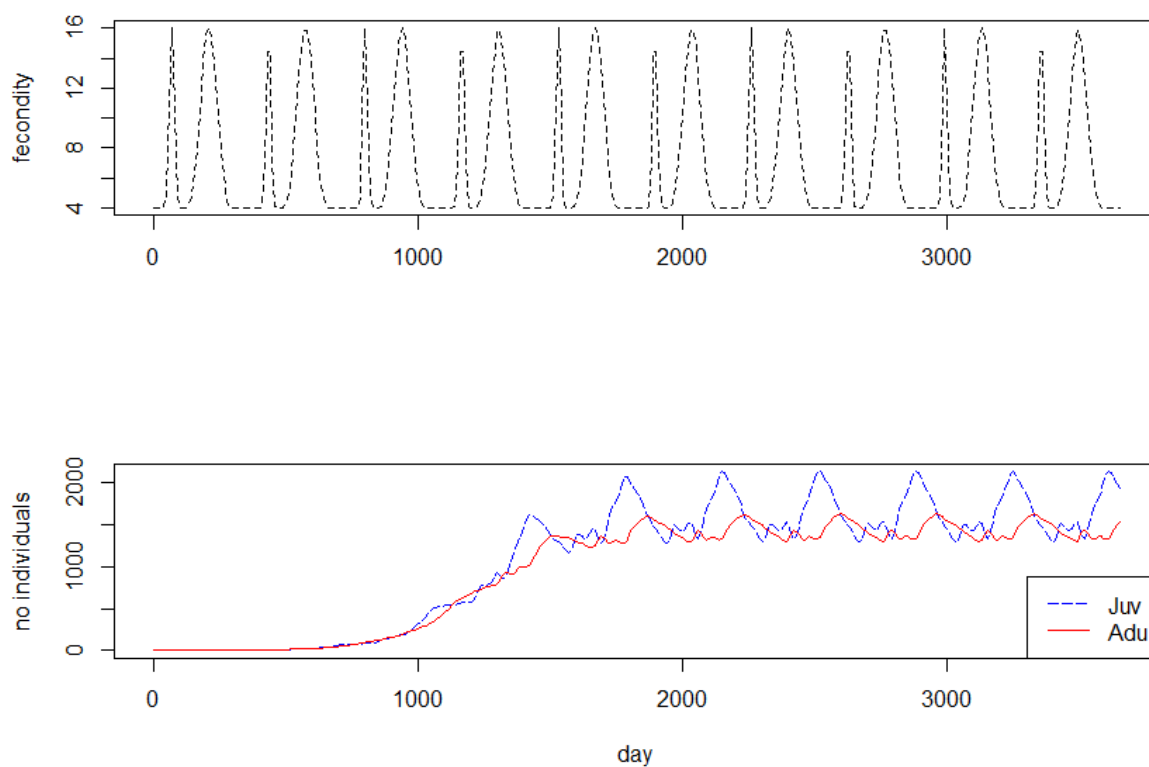
Le second facteur responsable des profils différents entre les milieux, est la variabilité de la fécondité moindre en milieu urbain où les rats, protégés par les infrastructures sont moins exposés aux variations de la température et des précipitations. L'étude de Himsworth *et al.* (2014) soutient cette hypothèse cependant la fonction de fécondité devrait être étayée par des études de terrain afin d'appuyer sa pertinence pour décrire la dynamique des populations.

## **Conclusions**

Cette approche décrit les variations des populations de juvéniles et d'adultes dans différents contextes environnementaux (urbain *vs* rural). Les résultats de ces simulations sont théoriques et basés sur des hypothèses concernant l'effet de la saison sur la fécondité, la capacité d'accueil et les taux de mortalité. Des données de terrain permettraient de vérifier si cette dynamique de population est conforme à la réalité biologique. Les fonctions produites pourraient alors être intégrées dans un modèle dynamique de persistance de *Leptospira*.



**Figure 30 – Dynamique d’une population type en milieu urbain**

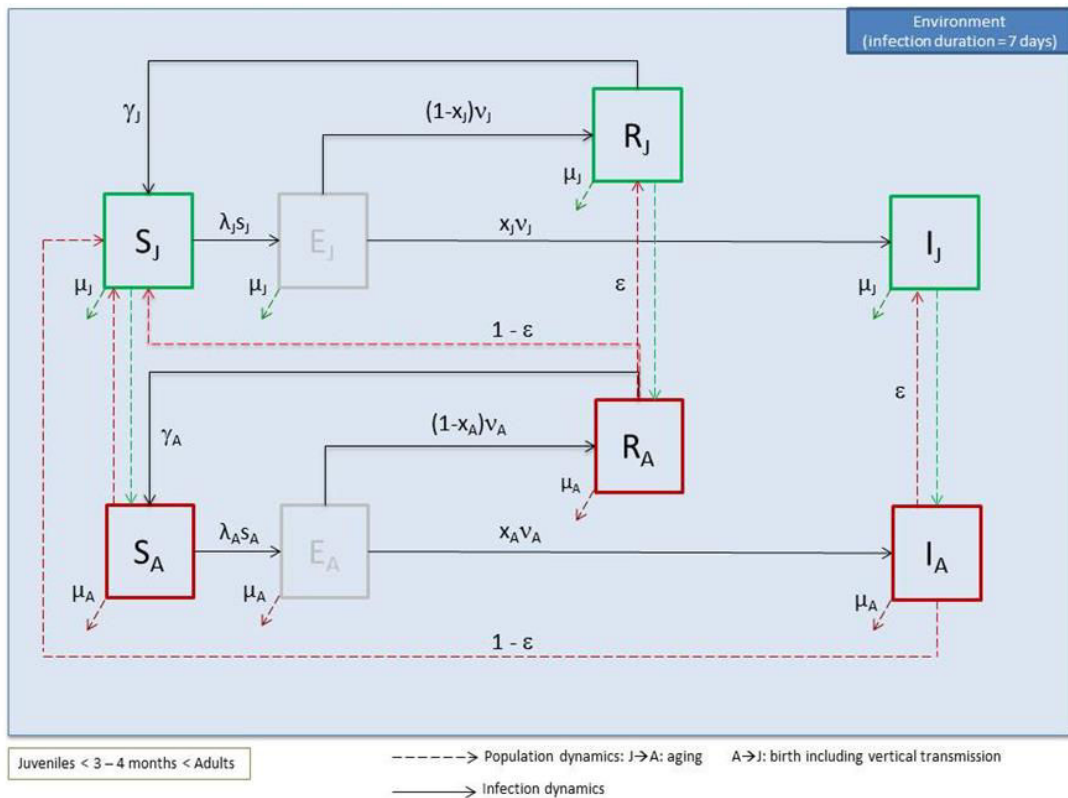


**Figure 11 – Dynamique d’une population type en milieu rural**

### 5.2.3. La dynamique de persistance de *Leptospira*

#### Conception du modèle

Le mécanisme de persistance est schématisé dans la figure 12. Chacune des classes d'âge a été subdivisée selon le statut infectieux (i.e. susceptible et infecté). Il est supposé qu'une fois l'infection acquise, elle devient chronique. En effet, l'infection chronique par *Leptospira* sérotype Icterohaemorrhagiae a été observée jusqu'à 7 mois post inoculation (date de fin de l'étude) et pourrait être plus longue (Thiermann, 1981). Toutefois, le portage chronique serait limité pour les autres sérotypes. La période de latence est décrite comme inférieure à 24 heures (Thiermann, 1980), ce court délai était considéré négligeable dans le modèle.



**Figure 12 – Mécanisme de persistance des leptospires au sein d'une population de rats**

avec la population juvénile (-<sub>J</sub>) et adulte (-<sub>A</sub>), S est la population susceptible, E est la population exposée en incubation (latence), I est la population de rats exposés, R est la population de rats ayant éliminé la bactérie et séro-converti.

Le modèle incluait trois voies de transmission potentielles, (1) transmission de la mère à la descendance, (2) transmission directe via le contact sexuel (fréquence-dépendante) ou la morsure contaminée (densité-dépendante) (Himsworth *et al.*, 2013c, 2014c), (3) la transmission indirecte par contact avec un environnement contaminé (densité-dépendante). L'importance relative de ces différentes voies n'est pas connue, les paramètres devraient donc permettre une variation de leur importance.

Parmi les deux classes d'âge, les transmissions par contact sexuel et par morsure contaminée ne concernent que les adultes. Les juvéniles sont confinés dans le nid jusqu'à un mois d'âge puis ont un espace vital limité jusqu'à la maturité sexuelle. Seuls les adultes sont donc potentiellement exposés aux bactéries de l'environnement.

Les leptospires de l'environnement sont disséminés par l'urine des individus infectés et persistent à l'extérieur de l'hôte pour une durée variable selon la nature du sol et les caractéristiques de l'air (*i.e.* pH, humidité). Holt *et al.*, (2006) décrivent la densité des leptospires dans l'environnement en fonction de la quantité de leptospires disséminée quotidiennement ( $K$ ) par individu infecté ( $A_I$ ) et du taux de mortalité bactérienne dans l'environnement (Eq. 6).

$$\frac{dL}{dt} = K \cdot A_I - \mu L, \quad \text{Eq.6}$$

Bien que la survie plus longue des leptospires dans un environnement humide soit décrite (Levett, 2001), la distinction de l'habitat urbain vs rural par ce critère d'humidité est hasardeuse. L'habitat urbain des rats est souvent associé à la présence d'eau (*e.g.* systèmes d'évacuation des eaux usées, égouts) et l'habitat rural où les rats vivent en terrier peut également être exposé à un taux d'humidité conséquent. De façon différente, les deux habitats ont un rapport à l'eau qui peut influencer la survie des leptospires dans le milieu. La modélisation de la persistance des leptospires selon l'environnement devrait donc inclure une variable métrologique (*e.g.* pH, humidité, tension superficielle du sol) plutôt que d'attribuer un paramètre urbain vs rural, *a priori*.

Les paramètres proposés pour ce modèle sont synthétisés dans le tableau 15.

**Table 15 – Valeurs des paramètres du modèle**

Paramètres	Symbol	Value	Units	References
Force d'infection	$\lambda$	-	jour <sup>-1</sup>	inconnu
latence	$1/\nu$	$\leq 1$	jour	Thiermann, 1980
Leptospires excrétées/jour/individu	$K$	$5.10^7$	jour <sup>-1</sup>	Estimé d'après Nally, 2006
Taux de mortalité des leptospires dans l'environnement	$1/\mu_L$	0.14	jour <sup>-1</sup>	Estimé d'après Bejo, 2004
Proportion de nouveaux-nés immunisés	$\epsilon$	-		inconnu <sup>6</sup>
Coefficient de transmission par contact sexuel	$x_{A,s}$	-		inconnu
Coefficient de transmission par morsure contaminée	$x_{A,b}$	-		inconnu
Coefficient de transmission par l'environnement	$\varphi$	-		inconnu
durée moyenne d'immunisation	$1/\gamma$	$\geq 220$	jours	Thiermann, 1981

## Conclusions et perspectives

L'intervention de plusieurs voies dans la transmission des leptospires chez le rat rend la conception d'un modèle dynamique complexe. Au-delà des nombreux paramètres inconnus, la principale limite pour l'obtention d'un modèle approprié est l'absence de connaissance de l'importance relative de ces différentes voies de transmission.

Dans le cadre des travaux de l'unité USC 1233 sur la leptospirose chez le rat, des études expérimentales sont en cours sur la dynamique de l'infection selon différentes voies d'inoculation (conjonctivale, sous cutanée et intra péritonéale). La voie sous cutanée pourrait mimer la transmission par morsure contaminée (contact direct) alors que la voie conjonctivale pourrait mimer d'autres voies de transmission telles que l'environnement ou le contact étroit entre congénères. Les données sur l'intensité et la durée de l'excrétion associée à chaque voie permettraient de compléter le modèle et de le rendre plus pertinent pour ses applications.

<sup>6</sup> Durée de l'immunité récemment publiée par Muslich *et al.*, 2014

Afin d'explorer la voie de transmission via l'environnement, des études consistant à mettre successivement un rat excréteur puis un rat sain dans un environnement et à mesurer le délai de séroconversion et d'excrétion urinaire des leptospires par le rat sain pourrait être menées. L'effet de l'environnement sur le délai de séroconversion et d'excrétion pourrait alors être investigué en faisant varier la nature de sa surface, par exemple, sable sec *vs* sable saturé en eau pour évaluer l'effet de la présence d'eau sur la persistance des leptospires. Ces données sont essentielles pour élaborer un modèle de persistance réaliste tout comme les connaissances sur le transfert de l'immunité et de l'infection de la mère au jeune. Dans ce cas, le suivi longitudinal de la séroconversion et du portage rénal dans une portée issue d'une mère infectée permettrait de mesurer le transfert d'immunité et/ou des bactéries. Une étude similaire a récemment été publiée faisant état de l'absence d'infection chez les nouveau-nés jusqu'à l'âge de 23 jours (Muslich *et al.* 2014). Cette information pourra être intégrée dans le modèle afin d'améliorer sa pertinence. Enfin des données collectées (délai de séroconversion) à partir d'études longitudinales sur une population de référence et selon une approche de capture-marquage-recapture permettraient d'étudier la validité d'un tel modèle sur le terrain.

L'état actuel des connaissances sur la leptospirose chez le rat ne permet pas d'appliquer un modèle suffisamment réaliste de la persistance des leptospires dans une population de rat. Les connaissances collectées au grès des avancées de la recherche pourront être incorporée dans notre modèle et les résultats alors obtenus permettront une meilleure compréhension des déterminants de la persistance bactérienne dans les populations et de la distribution des rats infectés. Ils fourniront un support de décisions pour la mise en place de mesure de maîtrise des populations de rats (*i.e.* maîtriser ces populations en ayant pour objectif la décroissance de la prévalence). Ils permettront également de quantifier l'effet relatif de facteurs déterminant la prévalence de l'infection dans ces populations, information nécessaire pour cibler la prévention des populations exposées aux rats.



### **Résumé de la Partie II:**

Les études épidémiologiques présentées dans cette partie, avaient pour objectif de mettre en œuvre de nouvelles méthodes de détection des agents pour le dépistage de zoonoses du rat et d'étudier la faisabilité de la mise en place d'une surveillance des facteurs de risque d'exposition de l'homme à ces agents pathogènes.

Les dangers micro biologiques prédominants chez les rats surmulots dans le Rhône étaient *Leptospira interrogans* (26%, IC95% = 20% - 33%) et l'hantavirus Séoul (SEOV) (14%, IC95% = 8% - 20%). La distribution spatiale des rats infectés variait d'un site à l'autre suggérant l'existence de déterminants spatiaux de l'infection. L'effet de la densité de rat sur la distribution du risque de portage n'a pas été mis en évidence. En revanche, la structure démographique de la population de rats, la densité de la population humaine exposée, et son niveau de revenu se sont révélés être des indicateurs du risque d'infection. Ainsi, nous avons montré que le portage de *L. interrogans* augmentait avec l'âge des rats (OR=3.4, 95% CI=1.3-8.5), la densité de la population humaine (OR=1.9, 95% CI=1.2-2.8) et la décroissance de ses revenus (OR= 0.6, 95% CI=0.4 - 0.8). Le portage de SEOV augmentait avec la décroissance des revenus (OR=0.5, 95% CI=0.3–0.8). Ces indicateurs pourraient être utilisés pour cibler la surveillance des ZAR et indiquer les zones potentiellement à risque de transmission des ZAR à l'Homme.

La micro-puce «Rongeurs commensaux» (projet WildTech) et la méthode «multispacer sequence typing» (MST) dont l'application sur des échantillons de rat est innovante, ont montré leur intérêt pour la surveillance des infections chez cette espèce. La micro-puce est adaptée à la détection de multiples pathogènes; elle vise une approche exploratoire pour déterminer la présence d'agents zoonotiques dans une population. La MST est adaptée à la discrimination des souches de *L. interrogans* chez les rats. Elle permet d'assurer la surveillance spatio-temporelle des souches parmi les rats et de réaliser une cartographie fine de la répartition des souches dans la perspective d'améliorer les enquêtes épidémiologiques.

Enfin, une modélisation de la dynamique de transmission des ZAR est essentielle pour la compréhension de la distribution des rats infectés, pour orienter la surveillance et mettre en place des mesures de contrôle des populations infectées. Un premier modèle est proposé dans ce manuscrit et pourra être appliqué à partir des résultats d'études à venir.

PARTIE **III**: INVESTIGATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES  
DE LA LEPTOSPIROSE CHEZ DES CIBLES  
(ANIMAUX DOMESTIQUES)



# PRÉAMBULE

## SUR LA RELATION LEPTOSPIROSES HUMAINES – LEPTOSPIROSES DES ANIMAUX DOMESTIQUES

### Introduction

Les animaux domestiques, notamment les chiens, les bovins et dans une moindre mesure les porcins, sont sensibles aux leptospires et ont des signes cliniques parfois comparables à ceux de l'homme (*cf.* Annexe 1). Ces animaux peuvent être à la fois réservoir de certains sérogroupes auxquels ils sont réceptifs mais peu sensibles, et hôte accidentel d'autres sérogroupes, et dans ce cas expriment la maladie. Outre les conséquences des leptospiroses en santé animale et sur l'économie agricole, les bactéries sont présentes au niveau rénal et sont excrétées dans les urines (Rojas *et al.*, 2010) représentant une probabilité d'infection humaine.

### Les animaux de rente – les bovins –

En Nouvelle Zélande où l'infection est endémique chez les ruminants – *séroprévalence bovine de 73% (CI<sub>95%</sub>=59%-83%)* (Fang *et al.*, 2014) –, les éleveurs et les employés d'abattoir sont des personnes à risque d'infection (Dreyfus *et al.*, 2014). En France, l'estimation de la séroprévalence chez les bovins – *21% à 35% selon les études* (André-Fontaine *et al.*, 2010; Tresse *et al.*, 2009) – est moindre. Le risque d'infection dans la population exposée aux animaux de rente n'a pas été évalué cependant ce risque pourrait être accru à l'avenir si l'influence du climat et l'intensification des échanges commerciaux s'avèrent augmenter la prévalence des infections leptospirosiques chez ces espèces. Parallèlement, l'impact de la leptospirose sur l'économie agricole (*cf.* §2.2.2) entraîne des besoins d'études sur les moyens de limiter le nombre de cas. Par conséquent, la surveillance, au-delà de son intérêt en santé humaine, aurait un impact sur l'économie de la santé animale, notamment en permettant d'améliorer la prophylaxie sanitaire et surtout médicale.

## Les chiens

Le chien est réservoir du sérotype Canicola et peut manifester la maladie lors d'infection par d'autres sérotypes (Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2001). Comme chez l'Homme, la fluctuation du nombre de cas de leptospirose canine peut présenter des pics saisonniers associés à la température ou la pluviométrie (Lee *et al.*, 2014). Plusieurs études ont investigué le rôle du chien comme vecteur de leptospires à l'Homme. Le portage rénal ou l'excrétion urinaire ayant été détecté par PCR chez 1.5% à 8% de chiens apparemment sains (Harkin *et al.* 2003; Gay *et al.* 2014; Llewellyn *et al.* 2013), ce dernier est donc une source potentielle de leptospires pour l'Homme cependant cet aspect est controversé par l'absence de cas décrit dans la littérature.

Dernièrement, le pic de cas cliniques de leptospirose canine rapporté en Suisse est en contradiction avec les rares cas autochtones enregistrés chez l'Homme (Utzinger *et al.* 2012; Francey *et al.* 2006). Malgré le contact fréquent et la proximité avec les animaux domestiques, l'homme développe rarement la maladie. En 2011, Barmettler (*et al.*, 2011) a étudié le risque de transmission zoonotique du chien avec une forme clinique aiguë au propriétaire ou au personnel de cliniques vétérinaires. Aucune des 91 personnes testées n'a présenté de séroconversion. De plus, les cas de transmission du chien à l'Homme restent sporadiques, voire rare dans la littérature et ne sont soutenus que par un profil sérologique ou spécifique analogue (Gay *et al.* 2014; Martins *et al.* 2012).

Le chien est souvent exposé à l'environnement extérieur incluant l'eau, en particulier les chiens d'élevage et les chiens de chasse qui ont un risque augmenté d'être infectés (Stokes *et al.* 2004; Ghneim *et al.* 2007). La similarité des facteurs d'exposition chez le chien et l'Homme ferait de ce premier une victime plutôt qu'une source (Martins *et al.* 2012). Dans ce contexte, le chien pourrait être une sentinelle de la présence de leptospires pathogènes pour l'homme dans l'environnement (Gatner *et al.* 2008).

## Conclusion

La part des leptospiroses humaines attribuable aux animaux domestiques n'est pas évaluée en France. En revanche, un certain nombre de ressemblances entre l'épidémiologie des leptospiroses humaines et animales sont observées et probablement liées au fait que l'Homme et les animaux domestiques sont exposés à des sources communes. Les animaux domestiques, à l'interface de l'Homme et de la faune sauvage notamment le rat surmulot, pourraient jouer le rôle d'hôte relais ou de sentinelle de la présence de leptospires pathogènes pour l'Homme dans l'environnement (Gatner *et al.* 2008). Par conséquent, la surveillance des leptospiroses chez les animaux domestiques qui n'a pas été mise en place jusque-là en France aurait de multiples intérêts: apporter une meilleure compréhension de l'épidémiologie des leptospiroses tant animales que humaines (*e.g.* distribution, facteurs de risque, sources) et développer une prévention des cas plus efficace chez l'animal et l'Homme.

Les chapitres de cette troisième partie visaient à produire des informations épidémiologiques pertinentes à partir de confirmations sérologiques de diagnostics cliniques vétérinaires de leptospirose.



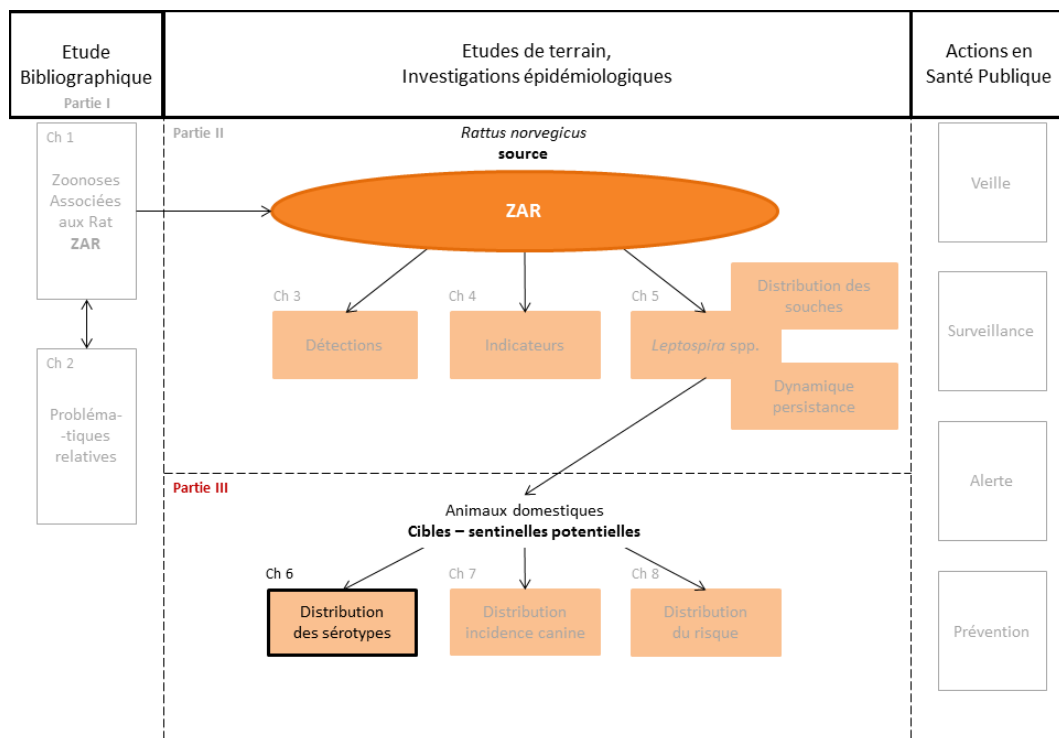
## CHAPITRE 6:

### DISTRIBUTION DE *LEPTOSPIRA* CIRCULANT

#### CHEZ LES CHIENS ET LES BOVINS

Parmi les leptospires, plus de 300 sérovars sont décrits à ce jour (Cerqueira et Picardeau, 2009) et ces sérovars sont rassemblés en sérogroupe selon leur proximité antigénique. La connaissance du sérogroupe infectant a une importance épidémiologique car les espèces réservoirs assurent la persistance d'un sérogroupe particulier. Par exemple, les bovins peuvent être réservoir du sérogroupe Sejroe (sérovir Hardjo) en France (André-Fontaine *et al.*, 2010). Documenter les sérogroupe infectants lors de leptospirose canine et bovine a en outre une importance sanitaire en permettant d'évaluer la pertinence des valences vaccinales disponibles pour ces espèces en France.

Le traitement des données de laboratoire a permis de décrire la distribution des sérogroupe impliqués dans les leptospiroses canines et bovines en France entre 2008 et 2011. Le résultat de ces travaux a fait l'objet d'un article publié dont le texte est intégralement rapporté dans ce chapitre.





## Short Report: Distribution of *Leptospira* Serogroups in Cattle Herds and Dogs in France

Florence C. Ayral,\* Dominique J. Bicout, Helena Pereira, Marc Artois, and Angeli Kodjo

WildTech Project, VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France; Biométrie et Épidémiologie, EPSP - TIMC, VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France; WildTech Project, VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France; Laboratoire des Leptospires, VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France

**Abstract.** A retrospective study was conducted to identify and describe the distribution pattern of *Leptospira* serogroups in domestic animals in France. The population consisted of cattle herds and dogs with clinically suspected leptospirosis that were tested at the “Laboratoire des Leptospires” between 2008 and 2011. The laboratory database was queried for records of cattle and dogs in which seroreactivity in *Leptospira* microagglutination tests was consistent with a recent or current infection, excluding vaccine serogroups in dogs. A total of 394 cattle herds and 232 dogs were diagnosed with clinical leptospirosis, and the results suggested infection by the *Leptospira* serogroup Australis in 43% and 63%, respectively; by the *Leptospira* serogroup Grippotyphosa in 17% and 9%, respectively; and by the *Leptospira* serogroup Sejroe in 33% and 6%, respectively. This inventory of infecting *Leptospira* serogroups revealed that current vaccines in France are not fully capable of preventing the clinical form of the disease.

Leptospirosis is a zoonotic bacterial disease that infects humans and domestic and wild mammals worldwide. This disease is important globally because of its worldwide distribution and its potentially fatal effects in humans. In Western Europe, France is one of the most affected countries, with a reported incidence of 0.37/100,000 inhabitants in 2011 (230 cases).<sup>1</sup>

The pathogenic agents of leptospirosis are bacteria from the genus *Leptospira*, specifically *Leptospira interrogans* sensu lato. Approximately 250 pathogenic serovars are now recognized and gathered into 24 antigenically related serogroups.<sup>2</sup> Although *Leptospira* can be maintained in wet environments for weeks, the main source of the bacteria is a wide range of domestic and wild mammals carrying specific *Leptospira* serogroups. Rodents are the predominant maintenance hosts of the bacteria, whereas infected dogs and cattle are less prevalent as hosts but may pose an important public health risk. Indeed, infectious urine excreted by infected domestic mammals<sup>3</sup> and its potential contact with human mucosa could lead to *Leptospira* transmission. In addition, leptospirosis induces significant economic losses caused by reproductive disorders in cattle herds. Vaccines against certain *Leptospira* serovars are available for humans, dogs, and cattle, but the range of *Leptospira* serogroups is much broader compared with the range that vaccination protects against. Additionally, there is no cross-immunity between *Leptospira* serogroups.

The vaccines available before 2012 for domestic animals in France only targeted dogs and included the serovars icterohaemorrhagiae and canicola. The canine vaccine has been augmented with the serovar grippotyphosa (Versican)<sup>®</sup>, and a bovine vaccine that includes the serovar hardjo is now available. Previous studies have questioned the reliability of these vaccines and have reported that certain uncommon serogroups are increasingly found to be the cause of clinical leptospirosis in the United States<sup>4</sup> and Europe.<sup>5</sup> Therefore, understanding the distribution of currently circulating serogroups is critical for prophylactic purposes and vaccine design. This study provides an overview of *Leptospira* serogroups in France that are currently circulating in dogs and cattle herds showing signs suggestive of leptospirosis.

From January 2008 to December 2011, veterinarians from across the country obtained samples from cattle and dogs showing clinical signs consistent with leptospirosis. Leptospirosis diagnosis was performed at the Laboratoire des Leptospires (Marcy L'Etoile, France) using a microagglutination test (MAT) as the reference test. The MAT was performed using a panel of antigens representing both ubiquitous serovars and locally prevalent serovars, with log<sub>2</sub> dilution series between 1:40 and 1:5120 in dogs and between 1:50 and 1:6400 in cattle. The following *Leptospira* serogroups, with related serovars in parentheses, were tested in both species: Icterohaemorrhagiae (icterohaemorrhagiae, copenhageni), Australis (munchen, australis, Bratislava), Autumnalis (autumnalis, bim), Bataviae (bataviae), Grippotyphosa (grippotyphosa, vanderhoedoni), and Sejroe (sejroe, saxkoebing, hardjo, wolffi). Four additional *Leptospira* serogroups, Canicola (canicola), Panama (manama, mangus), Pomona (pomona, mozdok), and Pyrogenes (pyrogenes), were only tested in dogs.

For cattle, no consensus is reported on the titer cut-off required to define an infected individual. Previously, the MAT showed a sensitivity and a specificity of 95% and 90%, respectively, at a cut-off  $\geq 1:50$  compared with microbiological cultures.<sup>6</sup> From this, occurrences of cattle leptospirosis at the herd level were determined by identifying signs suggestive of leptospirosis, such as reproductive disorders and the presence of at least one cow with MAT titers  $\geq 1:400$ . The cut-off was arbitrarily defined to increase the previously mentioned specificity. The predominant serogroup was then defined based on the maximum titer directed against one serogroup.<sup>7</sup> Cross-reactivity between serogroups frequently occurs in MAT<sup>8</sup> and results from a lack of specificity, especially from predominant non-specific immunoglobulin M (IgM) antibodies at the onset of infection.<sup>9</sup> In these cases, MAT results involve maximum titers directed against two or more serogroups, thus preventing determination of the infecting serogroup. The MAT results including maximum titers directed against two serogroups are still informative by indicating one or the other as potentially circulating. In contrast, consideration of more than two possible circulating serogroups is speculative and uninformative. Therefore, among MAT results including maximum titers directed against two or more serogroups only the ones with two serogroups (“mix” results) were considered in this study.

Most dogs monitored by veterinarians are vaccinated, which results in the development of seroreactivity directed

\*Address correspondence to Florence C. Ayral, USC 1233, PERS, WildTech Project, Université de Lyon, VetAgro Sup, F-69280, Marcy L'Etoile, France. E-mail: florence.ayral@vetagro-sup

against the icterohaemorrhagiae, copenhageni, and canicola serovars (called vaccine serovars). As previously described, in the current study, occurrences of canine leptospirosis were defined by signs suggestive of leptospirosis, such as acute renal failure or liver failure and at least one MAT titer of  $\geq 1:640$  against non-vaccine serovars.<sup>10</sup> The predominant serogroup was defined similar to that in cattle. However, the MAT results for which vaccine serogroup titers were equal to non-vaccine titers were analyzed separately, to minimize the impact of vaccination on the results.

To assess potential variation in the serogroup spread, mainland France was divided into six areas: North, Northwest, Northeast, Central, Southwest, and Southeast. The determination of the location of the different animals tested for the serogroups was based on the owner's address.

The MAT results of 394 cattle herds (570 cattle) suspected of having leptospirosis were used to determine the distribution of serogroups circulating in France. These MAT titer results ranged from 1:400 to 1:6400, with a median of 1:800. The predominant serogroups were Australis, Sejroe, and Grippityphosa, regardless of the titer cut-off (Figure 1), and a similar serogroup ranking was observed in the six defined regions (Figure 2). In total, 29 herds were found to contain cows with MAT results suggesting different predominant serogroups. The combinations of Australis and Sejroe ( $N = 16$ ) and of Sejroe and Grippityphosa ( $N = 7$ ) within a herd were predominant.

The MAT results of 232 dogs were included in the distribution. The MAT titer results ranged between 1:640 and 1:5120, with a median of 1:2580. According to the bar plots, the predominant serogroups were Australis and Grippityphosa, regardless of the titer cut-off. In particular, Australis was predominant in all six regions, whereas Grippityphosa was

only recorded in the four regions of western France (North, Northwest, Central, and Southwest).

In all, 66 dogs with equal maximum titers directed against vaccine serogroups and one non-vaccine serogroup were additionally considered. The distribution of the non-vaccine serogroups was Australis (75%), Pyrogenes (14%), Grippityphosa (5%), Sejroe (5%), and Panama (< 2%).

This study examined the distribution of infecting serogroups involved in clinical bovine and canine leptospirosis. The serogroups Australis and Grippityphosa were consistently predominant in the two species, and the results in dogs were consistent with the findings of a previous study in Germany.<sup>5</sup> Considering the sensitivity (Se) estimates related to the cut-off defined in dogs (Se = 22–67%),<sup>10</sup> the occurrence of leptospirosis may have been underestimated in this species. Nevertheless, the specificity (Sp) estimates in cattle (Sp  $\geq 90\%$ ) and dogs (Sp = 69–100%) and the high median titers associated with signs suggestive of leptospirosis supported a diagnosis of current or recent *Leptospira* infection. As previously reported, the MAT correctly predicted the infecting serogroup in 46–86% of cases<sup>7,11</sup>; the presumptive serogroup data appears to provide a broad overview of the serogroups commonly present in a population. Specifically, the majority of results (> 60% in cattle and > 72% in dogs) suggesting Australis and Grippityphosa infections and the consistency of the distribution, regardless of the cut-offs used for the two species, provided substantial evidence for Australis and Grippityphosa predominance in bovine and canine leptospirosis. These results also suggested that dogs and cattle could be exposed to the same sources of infection and/or the same infection pressure.

The spatial distribution of the predominant serogroups in cattle appeared homogeneous in all six regions, whereas in

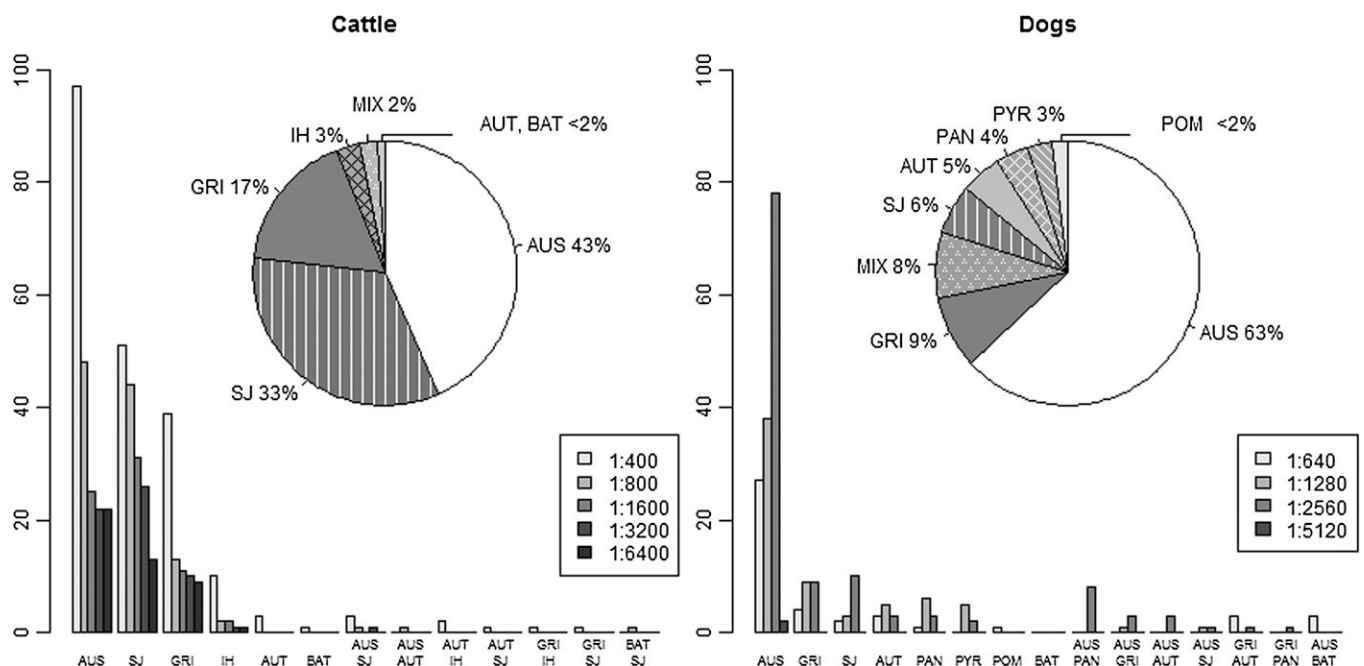


FIGURE 1. The distribution of *Leptospira* serogroups among 394 cattle herds and 232 dogs with suspected clinical leptospirosis (excluding microagglutination test (MAT) results indicating high icterohaemorrhagiae, copenhageni, and canicola titers in dogs). The bar plots show the distribution of the serogroups among 570 cows and 232 dogs, considering the maximum MAT titer. Australis (AUS), Autumnalis (AUT), Bataviae (BAT), Grippityphosa (GRI), Icterohaemorrhagiae (IH), Panama (PAN), Pomona (POM), Pyrogenes (PYR), and Sejroe (SJ), results including maximum titers directed against two serogroups (MIX).

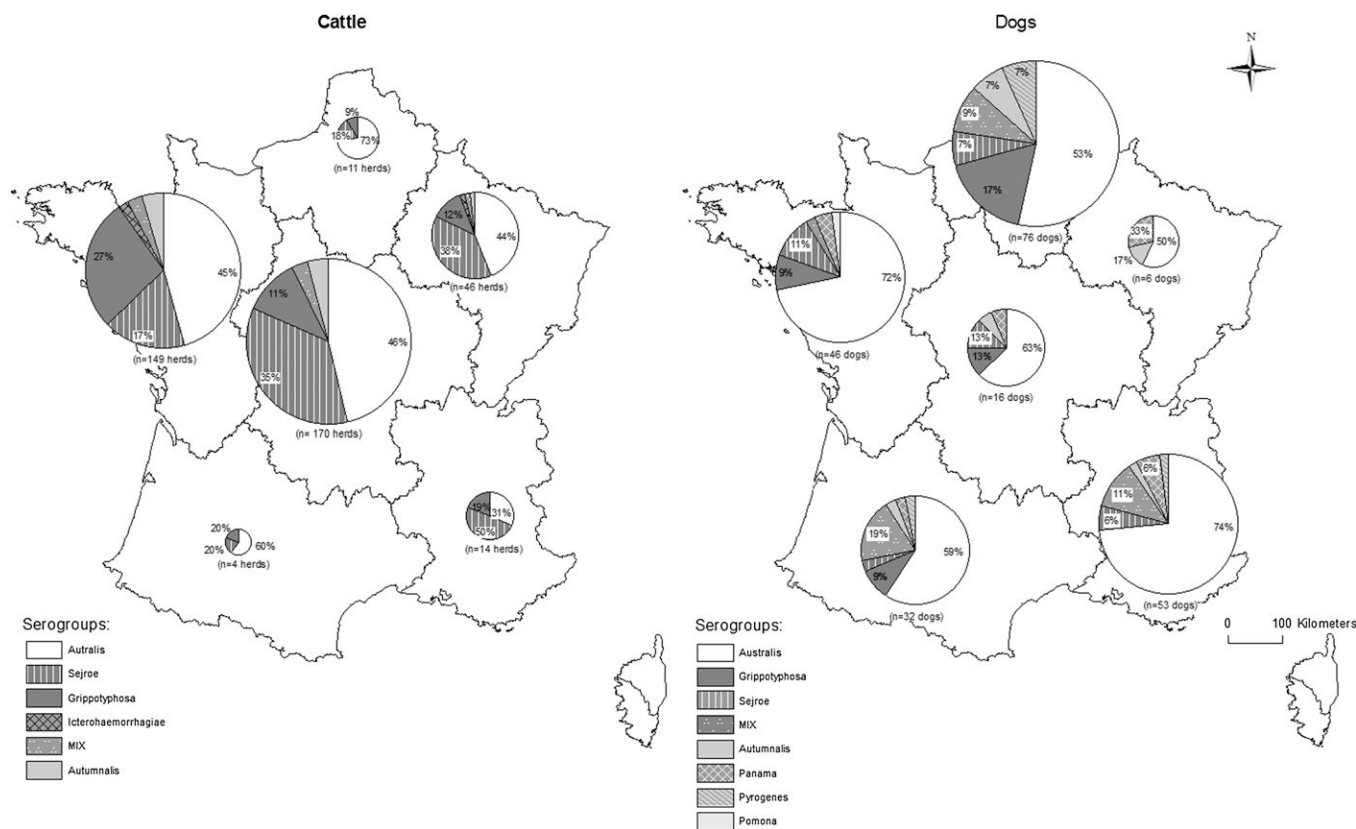


FIGURE 2. The spatial distribution of the infecting serogroups in 394 cattle herds and 229 dogs in six areas in mainland France: North, Northwest, Northeast, Central, Southwest, and Southeast. Three dogs were not considered because of missing location data, and one dog from Corse was excluded.

dogs, the distribution of Grippytyphosa was heterogeneous. This finding suggested that in contrast to cattle, the exposure of dogs to certain serogroups varied within mainland France.

The results of this study indicated that Sejroe was responsible for 30% of cases of bovine clinical leptospirosis. This finding suggested that the available bovine vaccine targeting this serogroup is capable of preventing one-third of the clinical cases. Nevertheless, additional serogroups, such as Australis and, to a lesser extent, Grippytyphosa, should be included to eliminate most *Leptospira*-related diseases in cattle. For dogs, it would be important to include Australis antigens in a canine vaccine to aid in preventing infection with the serogroup responsible for most clinical cases of leptospirosis in dogs in France.

This inventory of infecting *Leptospira* serogroups circulating in cattle and dogs should be considered when designing future vaccines to improve leptospirosis prevention. As part of a “one health” approach, this could lead to reduce human cases exposed to potentially infected domestic animals.

Received July 19, 2013. Accepted for publication July 4, 2014.

Published online August 4, 2014.

**Acknowledgments:** We thank the 7th Framework Program for Research and Technological Development, WildTech Project, for its financial support.

**Financial support:** This project was supported by the European Commission under the Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnology theme of the 7th Framework Program for Research and

Technological Development, grant agreement no. 222633, WildTech Project WP6 Epidemiology and Risk Assessment.

**Disclaimer:** The authors declare that no competing financial interests exist.

**Authors' addresses:** Florence C. Ayral, Helena Pereira, and Marc Artois, WildTech Project, Université de Lyon, VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France, E-mails: florence.ayral@vetagro-sup.fr, helena.zorbas@gmail.com, and marc.artois@vetagro-sup.fr. Dominique J. Bicot, Biomathématiques et Epidémiologie, EPSP-TIMC, VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France, E-mail: dominique.bicot@vetagro-sup.fr. Angeli Kodjo, Laboratoire des Leptospires, Université de Lyon, VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France, E-mail: angeli.kodjo@vetagro-sup.fr.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## REFERENCES

1. Dupouey J, Faucher B, Edouard S, Richet H, Kodjo A, Drancourt M, Davoust B, 2014. Human leptospirosis: an emerging risk in Europe? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 37: 77–83.
2. Cerqueira GM, Picardeau M, 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 9: 760–768.
3. Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS, Markey BK, Nally JE, 2010. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol* 29: 1305–1309.
4. Stokes JE, Kaneene JB, Schall WD, Kruger JM, Miller RA, Kaiser L, Bolin CA, 2007. Prevalence of serum antibodies against

- six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *J Am Vet Med Assoc* 230: 1657–1664.
5. Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nöckler K, Khon B, 2013. Distribution of *Leptospira* serogroups in dogs from Berlin, Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis* 13: 200–202.
  6. Hernández-Rodríguez P, Díaz CA, Dalmau EA, Quintero GM, 2011. A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *J Microbiol Methods* 84: 1–7.
  7. Chappel RJ, Goris M, Palmer MF, Hartskeerl RA, 2004. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 42: 5484–5488.
  8. Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Lunn KF, 2011. Variability in results of the microscopic agglutination test in dogs with clinical leptospirosis and dogs vaccinated against leptospirosis. *J Vet Intern Med* 25: 426–432.
  9. Levett PN, 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296–326.
  10. Miller MD, Annis KM, Lappin MR, Gill M, Lunn KF, 2008. Sensitivity and specificity of the microscopic agglutination test for the diagnosis of leptospirosis in dogs. *J Vet Intern Med* 22: 787 (Abstract).
  11. Levett PN, 2003. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis* 36: 447–452.



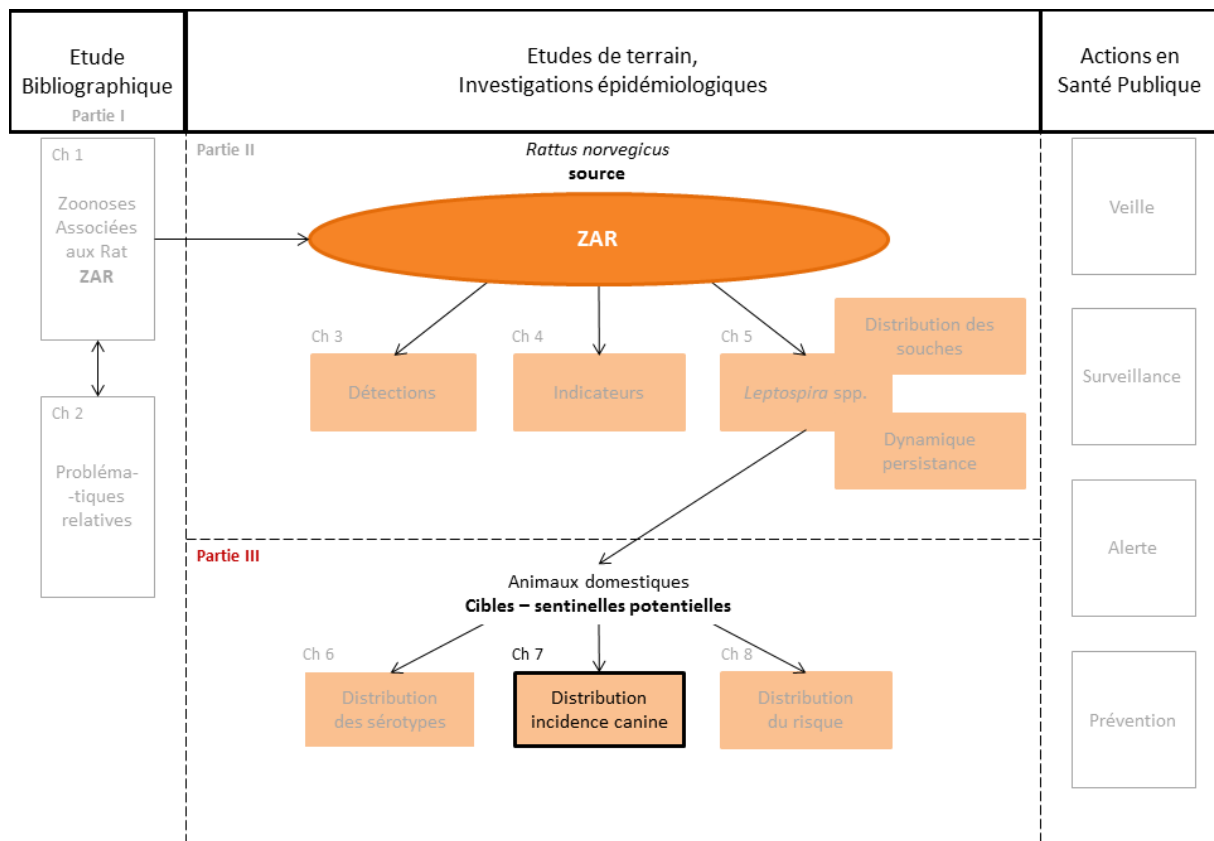
## CHAPITRE 7:

### DISTRIBUTION SPATIO-TEMPORELLE DE L'INCIDENCE

#### DE LA LEPTOSPIROSE CANINE EN FRANCE

La surveillance de la leptospirose chez le chien est un enjeu en santé animale et potentiellement en santé humaine de par les ressemblances entre l'épidémiologie des maladies canine et humaine. Cependant, aucun dispositif n'est en place à ce jour.

Dans ce chapitre nous présentons une méthode de traitement des données de laboratoire afin de décrire et d'analyser la distribution spatio-temporelle d'un indicateur de l'incidence de leptospirose canine en France entre 2008 et 2012. Ce chapitre est organisé sous la forme d'un article scientifique actuellement en préparation.



## 7.1. Introduction

*Leptospira* spp. peut infecter les chiens et implique des conséquences cliniques variables selon les souches (Sykes *et al.*, 2011). Parmi les études antérieures sur la leptospirose canine, certaines étudient la prévalence de la maladie sur des populations hospitalières (Ward *et al.*, 2002, 2004) ou analysent des données de laboratoire à l'échelle nationale (Moore *et al.*, 2006). Mise à part Major *et al.*, 2014, aucune étude ne rapporte l'incidence de la maladie à l'échelle du pays à défaut de connaissance de la population à risque.

Le test sérologique de micro-agglutination (MAT) est le test de référence pour le diagnostic de la leptospirose. Malgré sa sensibilité et sa spécificité médiocres, 22% à 67% et 69% à 100% respectivement (Miller *et al.*, 2008), il est largement utilisé pour sa rapidité, son coût moindre et sa potentielle détermination du sérotype infectant. Le sérotype pour lequel l'agglutination est détectée à la plus haute dilution est indicatif du sérotype infectant cependant, les réactions croisées entre sérotypes sont fréquentes (Levett, 2001).

Les données de laboratoire sont potentiellement utilisables à des fins de surveillance. La présente étude construit un indicateur de l'incidence cumulée de la leptospirose canine en France à partir de l'estimation de la population canine à risque et des résultats de MAT issus du Laboratoire des Leptospires-Lyon (i.e. laboratoire vétérinaire référent pour le diagnostic expérimental des cas de leptospirose animale). La pertinence de l'incidence ainsi obtenue et l'analyse spatio-temporelle sont discutées au regard des connaissances actuelles sur l'épidémiologie de la maladie.

## 7.2. Matériel et Méthode

### **Estimation du nombre de cas**

Lors d'une suspicion clinique de leptospirose canine (*e.g.* fièvre indéterminée, insuffisance hépatique et/ou rénale, hémorragie pulmonaire) par les praticiens vétérinaires en France, un échantillon approprié (*e.g.* sang, sérum ou urine) peut être envoyé au Laboratoire des Leptospires – Lyon pour une confirmation du diagnostic par MAT ou PCR. À partir de la base de données du Laboratoire des Leptospires-Lyon, une requête a permis de considérer tous les chiens ayant fait l'objet d'une suspicion

clinique par les vétérinaires praticiens et dont les prélèvements ont été analysés par le test de micro agglutination (MAT) entre janvier 2008 et décembre 2012.

Le choix du seuil de positivité a été déterminé pour définir les cas à partir d'un unique résultat de MAT. Un seuil de positivité  $\geq 1:640$  a été préalablement décrit comme diagnostic (Fraune *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2008). Les cas probables de leptospirose canine ont donc été définis en sélectionnant les résultats de MAT ayant au moins un titre  $\geq 1:640$ . Pour quelques chiens, une cinétique d'anticorps a été faite (i.e. plusieurs résultats MAT pour un même individu), le résultat présentant les titres les plus hauts a été conservé.

Le statut vaccinal des chiens atteints de leptospirose n'était pas enregistré dans les commémoratifs envoyés pour confirmation au laboratoire. Dans ce contexte, nous avons construit un algorithme (Figure 13) qui avait pour objectif de distinguer les cas cliniques de leptospirose des résultats potentiellement associés à un profil vaccinal. Le groupe des cas excluant les résultats avec des titres dirigés contre *Icterohaemorrhagiae* (IH) et/ou *Canicola* (CAN) ( $C_{\text{excl}}$ ) minimise les faux positifs (i.e les cas non exposés aux leptospires pathogènes mais exposés à la vaccination) cependant certains cas causés par des leptospires pathogènes du sérogroupes IH ou CAN ont potentiellement été exclus. Le groupe des cas incluant les résultats avec des titres dirigés contre IH et/ou CAN ( $C_{\text{incl}}$ ) regroupe les cas exposés à des leptospires pathogènes quel qu'en soit le séro groupe mais aussi des chiens potentiellement sains ayant été exposés à la vaccination.

Les antigènes utilisés sont issus des souches représentatives des sérogroupes rapportés dans la région et connues pour être maintenues par l'espèce hôte testée. Le panel des souches utilisées pour le MAT au Laboratoire des leptospires est décrit dans l'Annexe 20.

Les chiens enregistrés avec des données manquantes concernant la date d'analyse ou l'adresse du propriétaire étaient exclus de l'analyse. Le code postal de résidence du propriétaire a été utilisé pour localiser le chien au niveau du département. La durée de l'incubation étant de 1 à 7 jours (Sykes *et al.*, 2011), la date présumée d'exposition du cas a été estimée à 7 jours précédents la date d'analyse.



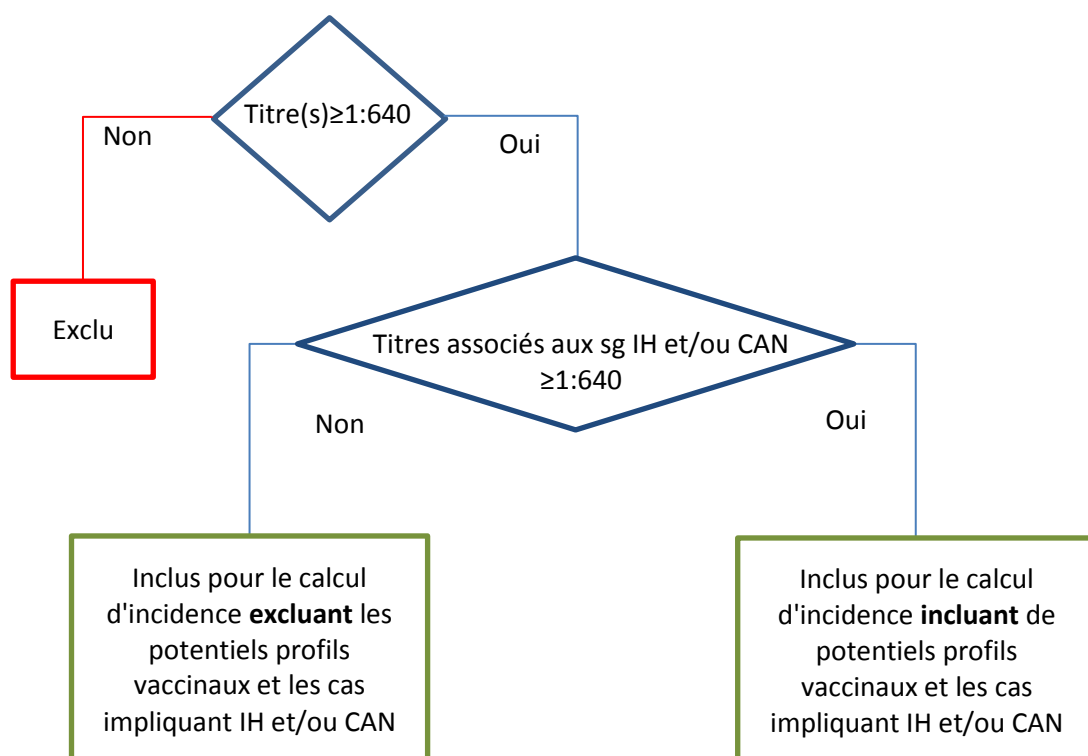


Figure 13 – Algorithme de discrimination des cas de leptospirose canine

### Estimation de la population canine<sup>1</sup>

La population canine du département « i » a été estimée pour les années 2008 à 2012 à partir des données enregistrées par la Société d'Identification des Carnivores Domestiques (ICAD). L'ICAD enregistre le signalement des chiens de France, identifiés selon la réglementation<sup>2</sup>. Une large partie de la population canine y est donc représentée. Le modèle de survie décrit par Egenvall *et al.*, 2005 a permis de calculer le nombre de chiens vivants une année donnée à partir de l'âge et du genre. L'effectif des chiens a été réparti par département suivant le code postal de résidence du propriétaire.

### Indicateur de l'incidence cumulée

L'indicateur que nous avons construit est littéralement une prévalence (*i.e.* nombre de cas / population canine) toutefois, le faible nombre de cas nous permet d'approximer la population canine à la

<sup>1</sup> Ce travail a été mené en collaboration avec Solande Same dans le cadre de son stage de Master 2 EPIRIS

<sup>2</sup> Arrêté du 2 juillet 2001

population à risque afin d'obtenir un indicateur de l'incidence cumulée. Cet indicateur traduit un effet dynamique qui répondait aux objectifs de l'étude.

L'indicateur de l'incidence cumulée annuelle de la leptospirose canine dans le département « i » a été calculé comme suit,

$$I_{p,i,a} = Incidence_{p,i,a} = \frac{C_{p,i,a}}{Pop_{i,a}}, \quad \text{Eq.1}$$

avec le  $C_{p,i,a}$  et la  $Pop_{i,a}$ , les estimations des effectifs de cas et de la population canine dans le département « i » et à l'année « a » respectivement. L'indice « p » distingue le groupe de cas incluant IH et/ou CAN ( $C_{incl}$ ) et le groupe de cas excluant IH et/ou CAN ( $C_{excl}$ ).

L'indicateur de l'incidence cumulée annuelle moyenne était la moyenne des  $I_{p,i,a}$  sur les 96 départements et calculé pour les années « a » 2008 à 2012 telle que,

$$I_{moy\ p,a} = \frac{\sum_{i=1}^{96} I_{p,i,a}}{96}, \quad \text{Eq.2}$$

L'indicateur de l'incidence cumulée mensuelle a été calculé comme suit,

$$I_{mens\ p} = \frac{\sum_{i=1}^{96} \sum_{a=2008}^{2012} C_{mens\ p,i,a}}{\sum_{i=1}^{96} \sum_{a=2008}^{2012} Pop_{i,a} * 5}, \quad \text{Eq.3}$$

avec  $C_{mens\ p,i,a}$  le nombre de cas mensuels du groupe « p » dans le département « i », l'année « a ».

### Analyses statistiques

Les distributions de  $I_{p,i,a}$  et  $I_{mens\ p}$  ont été comparées entre les groupes « p » par un test de corrélation de Pearson. Une valeur de  $\alpha \leq 0.05$  était considérée pour rejeter l'hypothèse  $\tau=0$  (i.e. absence de corrélation). Au préalable, la normalité et l'homoscédasticité des distributions de  $I_{p,i,a}$  et  $I_{mens\ p}$  ont été testées par le test de Shapiro et le test de Bartlett ou de Levene respectivement. Pour chaque test, une valeur de  $\alpha \leq 0.05$  était considérée pour rejeter l'hypothèse de normalité et d'homoscédasticité respectivement.

Dans chaque groupe « p », la dispersion des valeurs  $I_{p,i,a}$  selon l'année et de  $I_{mens\ p}$  selon le mois ont été testées par une régression linéaire généralisée de Poisson ou une ANOVA selon les conditions préalables.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées par R (R Development Core Team, Vienne, Autriche) version 2.14.2.

### **Analyses spatiales**

La distribution spatiale des deux valeurs d'incidence par département ainsi obtenues (incluant vs excluant IH et/ou CAN) a été visualisée avec ArcGIS version 9.3 (ESRI, Redlands, CA, USA). Les coordonnées géographiques du département de provenance, la date présumée d'exposition et l'effectif moyen des populations ont été importées dans le logiciel Satscan version 9.3.1 (Boston, USA) pour l'analyse spatio-temporelle. Les zones et périodes où l'incidence était plus élevée (i.e. clusters spatio-temporels) ont été investiguées par un modèle de poisson, avec une fenêtre circulaire incluant au maximum 25% de la population à risque. Des analyses indépendantes ont été menées pour les cas incluant vs excluant IH et/ou CAN. Les clusters identifiés ont été ensuite visualisés avec ArcGIS.

### **7.3. Résultats**

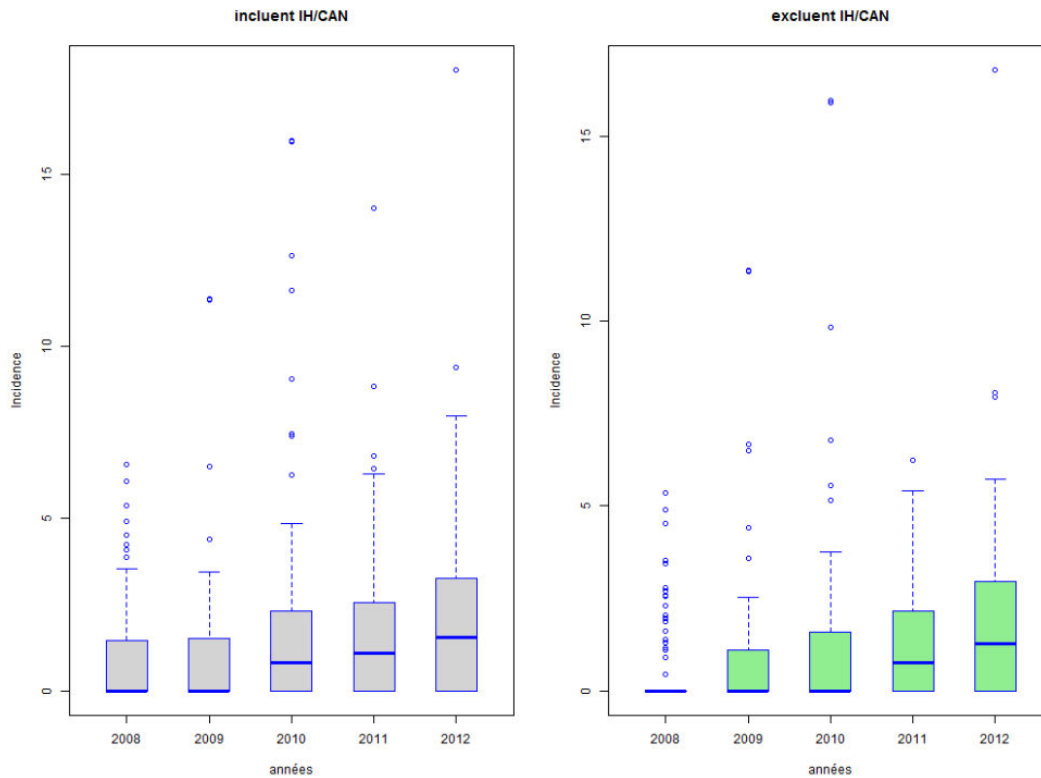
Dans la suite du document, le terme d'« incidence cumulée » est réduit au terme « incidence » pour une lecture plus aisée.

Sept-cent-quarante-sept ( $n=747$ ) cas incluant IH et/ou CAN ( $C_{incl}$ ) et 566 cas excluant IH et/ou CAN ( $C_{excl}$ ) ont été considérés dans la suite des analyses. L'incidence moyenne annuelle sur la période de l'étude était de 1,5/100 000 chiens-an pour le groupe des  $C_{incl}$  et 1,3/100 000 chiens-an pour le groupe des  $C_{excl}$ . La variabilité de la distribution de  $I_{p,i,a}$  selon l'année et le groupe est représentée dans la figure 14.

### **Variabilité annuelle**

La distribution des  $I_{p,i,a}$  ne suivait pas une loi normale ( $p\text{-valeur}<0,001$ ), en revanche l'homoscédasticité était respectée ( $p\text{-valeur}=0,05$ ). Un coefficient de corrélation  $\tau=0,897$  ( $p\text{-valeur}<0,001$ ) met en évidence l'évolution parallèle des valeurs de  $I_{incl,i,a}$  et  $I_{excl,i,a}$  selon l'année.

L'absence de normalité des données ont conduit à l'utilisation d'une régression logistique de Poisson pour évaluer l'effet de l'année sur l'incidence.  $I_{incl,i,a}$  augmentait de 23% d'une année sur l'autre entre 2008 et 2012 ( $p\text{-valeur} < 0,001$ ).  $I_{excl,i,a}$  augmentait de 31% d'une année sur l'autre entre 2008 et 2012 ( $p\text{-valeur} < 0,001$ ).

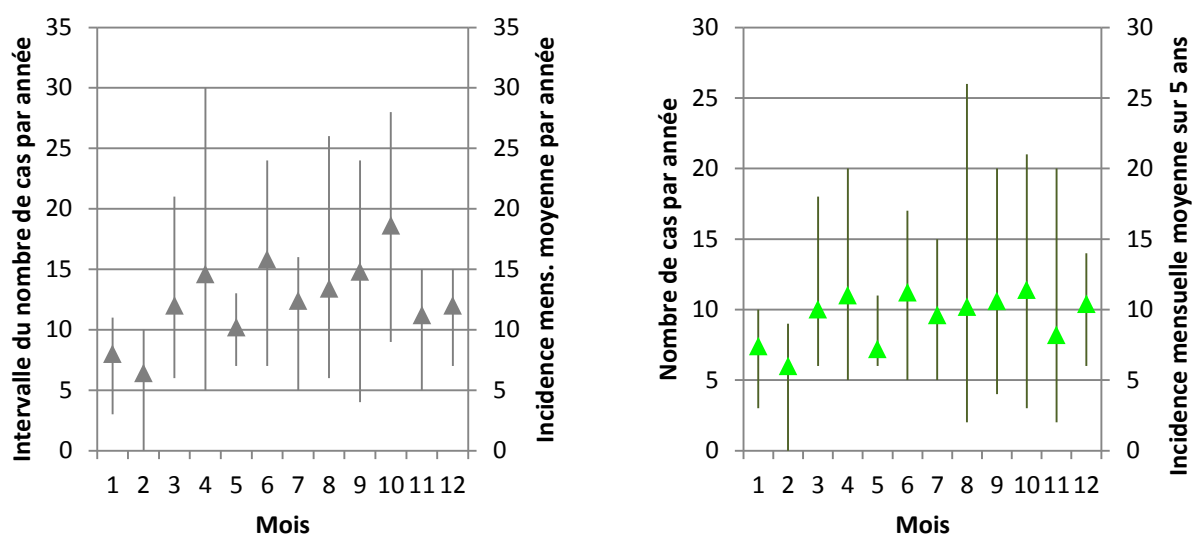


**Figure 14 – Distribution de l'indicateur de l'incidence départementale de leptospirose canine selon l'année**

### Variabilité mensuelle

Les valeurs  $I_{mens\ incl}$  et  $I_{mens\ excl}$  respectaient les conditions de normalité (p-valeur=0.99 et p-valeur=0.12 respectivement) et d'homoscédasticité (p-valeur = 0.05). Un coefficient de corrélation  $\tau=0.91$  (p-valeur<0.001) met en évidence l'évolution parallèle des valeurs de  $I_{mens\ incl}$  et  $I_{mens\ excl}$  selon le mois. Les graphiques de la figure 15 rendent compte de cette évolution parallèle.

La comparaison de variance (ANOVA) entre les valeurs d' $I_{mens\ p}$  n'a pas mis en évidence d'effet du mois dans chacun des groupes « p » (p-valeur<sub>incl</sub> = 0.114 et p-valeur<sub>excl</sub> = 0.077).

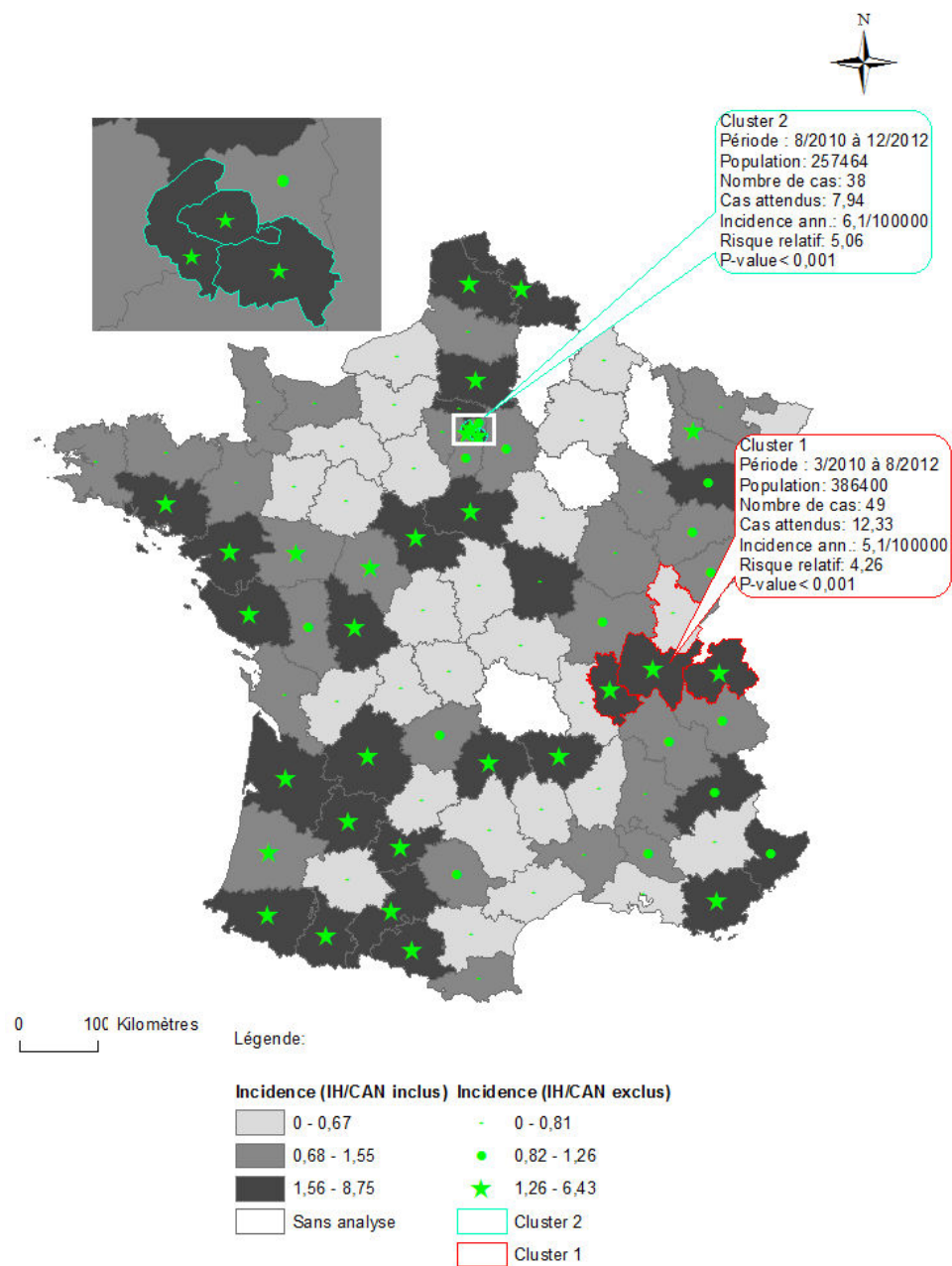


**Figure 15 – Distribution de l'indicateur de l'incidence mensuelle,**  
incluant (gris) vs excluant (vert) IH et/ou CAN  
les droites verticales représentant l'intervalle du nombre de cas enregistrés pour un mois

### Distribution spatio-temporelle

La distribution spatiale de l'incidence semble hétérogène dans les deux groupes (Figure 16). Dans la majorité des départements où la valeur de l'incidence incluant IH et/ou CAN était comprise dans le troisième quartile (i.e. valeurs d'incidence les plus hautes en gris foncé), la valeur de l'incidence excluant IH et/ou CAN était elle aussi comprise dans le troisième quartile (i.e. valeurs d'incidence les plus hautes indiquées par une étoile verte).

Les analyses spatio-temporelles à partir des  $I_{p,i,a}$  ont identifié quatre clusters (Cf. Annexes 21-22) dont trois étaient identiques quel que soit le groupes « p ». Les deux clusters associés à une valeur p (*p-value*) inférieure à 0.001 ont été représentés et caractérisés sur la figure 16.



**Figure 16 – Distribution spatiale de l'indicateur d'incidence de leptospirose canine et représentation de deux clusters spatio-temporels**

## 7.4. Discussion

Cette étude a utilisé des résultats de MAT enregistrés au Laboratoire des Leptospires à des fins de surveillance des cas cliniques de leptospirose canine. La conception d'un indicateur départemental de l'incidence cumulée, permet une analyse spatio-temporelle de la maladie. L'étude de la temporalité suggère une augmentation croissante de l'incidence cumulée annuelle et une variabilité de l'incidence cumulée mensuelle limitée. L'approche spatiale suggère une distribution hétérogène de l'incidence.

### **L'indicateur**

L'indicateur de l'incidence<sup>3</sup> annuelle de la leptospirose canine en France obtenu dans cette étude était de 1,3/100 000 chiens-an et 1,5/100 000 chiens-an selon les groupes. Une étude menée en Suisse sur les données de 2003 à 2012 rapporte une incidence de 5.88/100 000 chiens-an à partir de cas hospitalisés (Major *et al.*, 2014). L'écart entre les valeurs obtenues en France et la valeur déterminée en Suisse peut être lié à une exposition différente ou à la méthodologie propre à chacune des études. Les valeurs d'incidence doivent donc être considérées avec précaution. Des biais de sélection et de mesure peuvent en effet altérer la qualité des informations obtenues.

Les biais de sélection concernent le recrutement, la localisation et la date présumée d'infection des cas. De par son statut de Laboratoire de référence, les cas enregistrés au Laboratoire des Leptospires représentent probablement une large partie des demandes de diagnostic de laboratoire lors de suspicion clinique de leptospirose canine. Cependant d'autres laboratoires peuvent être sollicités et d'autres tests peuvent être utilisés entraînant une potentielle sous-estimation de l'incidence. Par ailleurs, le tableau clinique non spécifique de la leptospirose et les manifestations aiguës et sévères entraînant une mort rapide peuvent contribuer au sous-diagnostic et à la sous-estimation des cas cliniques. La valeur de l'indicateur annuel défini dans cette étude,  $I_{moy p,a}$ , ne devrait donc pas être utilisée comme une valeur d'incidence au sens propre du terme. L'intérêt de l'étude se porte donc essentiellement sur la distribution des valeurs relatives de cet indicateur dans le temps et dans l'espace.

Les zones à risque d'exposition aux leptospires chez le chien sont variables selon les études. Des habitats tant ruraux qu'urbains sont rapportés comme des lieux d'exposition (Moore *et al.*, 2006;

---

<sup>3</sup> Incidence cumulée

Raghavan *et al.*, 2011, 2012; Ward *et al.*, 2004). L'exposition peut donc se faire à distance du lieu de résidence. Dans ce contexte, l'indicateur basé sur utilisation du code postal de résidence des propriétaires n'est pas optimal pour localiser le risque d'exposition. Cependant, Raghavan *et al.* (2012), suggère que l'exposition des chiens est fréquemment à proximité du lieu de résidence (< 2.5 km) minimisant l'impact du biais d'information relatif à la localisation.

La date présumée de l'exposition a été estimée à 7 jours précédant la date d'analyse. Elle peut être erronée due à la variabilité du délai d'incubation (Sykes *et al.*, 2011) et au délai d'envoi de l'échantillon. Ce biais d'information peut être considéré comme non différentiel du fait de la distribution probablement aléatoire de cette variabilité. De plus, l'étude temporelle au niveau du mois et de l'année limite l'impact de potentielles variations dans la date d'exposition qui sont de l'ordre de quelques jours.

Les biais de mesure sont liés aux limites du MAT pour détecter les infections en cours. Le MAT est basé sur l'évaluation semi-quantitative des anticorps dirigés contre les différents sérogroupes de leptospires. Toutefois, la détection des anticorps peut être limitée par le délai de séroconversion et par l'usage des antibiotiques avant le prélèvement de sérum (Sykes *et al.*, 2011). A l'inverse, le MAT peut détecter des anticorps en absence d'infection lors d'exposition antérieure ou après la vaccination. En France, la majorité des chiens sont vaccinés contre la leptospirose. Avant 2012, des vaccins bivalents contenant les sérovars Icterohaemorrhagiae et Canicola étaient disponibles et largement utilisés. De cette vaccination résulte une séroconversion dirigée contre les sérogroupes Icterohaemorrhagiae (IH) et Canicola (CAN) et sans protection croisée pour les autres sérogroupes (Klaasen *et al.*, 2003). Une majeure partie de la population canine aurait donc des anticorps dirigés contre les sérogroupes IH et CAN sans pour autant avoir été exposée à des leptospires pathogènes. Des réactions croisées fréquentes sont rapportées avec le MAT (Levett, 2001) et peuvent contribuer au biais de mesure avec une classification à tort dans l'un des deux groupes. La corrélation entre les indicateurs d'incidence  $I_{moy p,a}$  et  $I_{mens p}$  des deux groupes « p » sont en faveur d'une même population d'origine, potentiellement la population des chiens atteints de leptospirose clinique. Une surreprésentation des profils vaccinaux dans le groupe « incl » aurait probablement impliqué une indépendance des deux groupes. L'algorithme de classification des cas permettrait donc d'élaborer un indicateur basé sur la sérologie et potentiellement affranchi de l'effet de la vaccination.



Le seuil de positivité choisi ( $\geq 1:640$ ) a été préalablement décrit comme diagnostic avec une sensibilité et une spécificité de 22% à 67% et 69% à 100% respectivement (Fraune *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2008). Le choix de ce seuil est donc en faveur d'une sous-estimation des cas.

Enfin, la population canine a été estimée à partir des données de l'ICAD qui recense l'ensemble des chiens identifiés en France. La réglementation rend obligatoire cette identification et le recensement d'une large partie de la population peut être attendu. Cependant, aucune évaluation de ce dispositif n'est en place et ne permet pas d'évaluer une potentielle sous-estimation de la population. De plus, la date de décès est rarement documentée. L'utilisation d'un modèle de survie permet d'estimer la population effective par année mais peut entraîner une variation par rapport à la population réelle.

### **La distribution spatio-temporelle**

L'analyse temporelle de l'indicateur d'incidence suggère une augmentation constante depuis 2008. Cette tendance est aussi constatée en Suisse (Major *et al.*, 2014) qui souligne un potentiel lien avec les variations météorologiques et environnementales. Ces facteurs, bien décrit chez l'Homme (Bharti *et al.*, 2003) le sont aussi en médecine vétérinaire (Lee *et al.*, 2014). Le code postal de résidence du propriétaire ne permettait pas de localiser précisément l'exposition des cas et limitait l'intérêt de les mettre en relation avec des données météorologiques ou environnementales.

L'effet du climat sur l'incidence de la leptospirose humaine est particulièrement étudiée dans les pays tropicaux et subtropicaux où le nombre de cas est le plus élevé (Bharti *et al.*, 2003). Les conditions climatiques y sont contrastées par de fortes précipitations et d'importantes inondations qui favorisent la mise en évidence de tels effets (Pereira *et al.*, 2014; Watson *et al.*, 2007). En Amérique du Nord et en Suisse, un effet des facteurs météorologiques ou de la saison sur l'incidence de la leptospirose canine a également été décrit malgré des phénomènes climatiques moins marqués que dans les pays tropicaux. Une incidence accrue est déterminée en été et/ou en automne selon les études (Major *et al.*, 2014; Prescott *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2002).

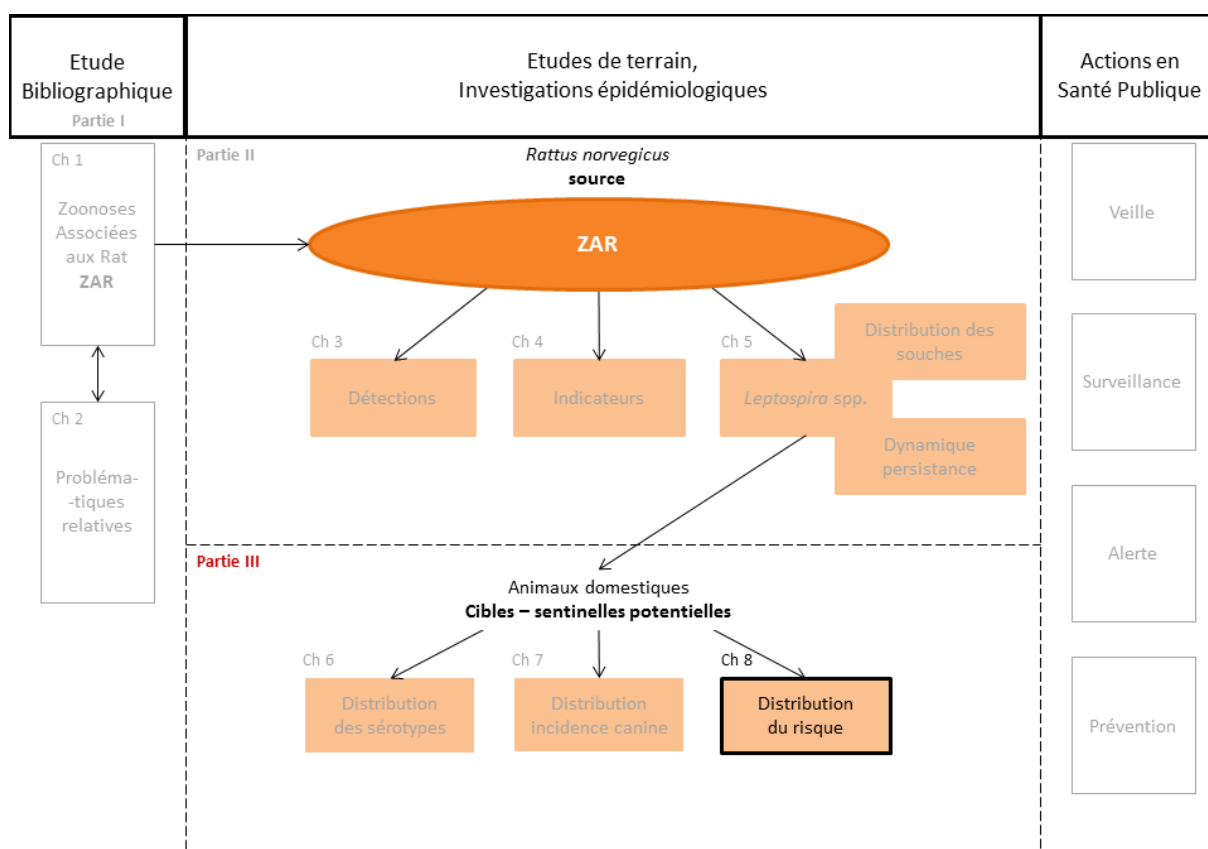
Notre hypothèse était que le climat tempéré en France ne serait pas suffisamment contrasté pour mettre en évidence un effet du mois sur l'indicateur d'incidence. La source de l'infection canine serait relative à la présence d'hôtes réservoirs contaminant le milieu plus qu'au maintien prolongé de la bactérie en présence de chaleur et d'humidité. L'absence d'effet du mois sur l'indicateur de

l'incidence est en faveur de cette hypothèse. En outre, les deux clusters spatio-temporels mis en évidence ont été déterminés sur des périodes de plus de 2 ans excluant tout effet de la saison. La saison rapportée par ailleurs comme facteur de risque pourrait être liée au mode de vie du chien plus qu'à un risque accru de contamination de l'environnement. La saison ne devrait donc pas orienter la suspicion clinique du vétérinaire praticien dans un pays tempéré comme la France.

L'analyse spatiale suggère une distribution hétérogène de l'indicateur d'incidence malgré l'identification de clusters. Ce résultat est en accord avec une précédente étude menée en Amérique du nord (Moore *et al.*, 2006). L'identification de zones à risque était limitée plus probablement parce que les facteurs qui mènent à l'infection sont multiples (*e.g.* mode de vie de l'animal, les facteurs environnementaux, la faune en place) et peuvent varier dans le temps et dans l'espace.

## **Conclusions**

La leptospirose canine est une maladie dont l'épidémiologie est proche de la leptospirose humaine. La position du chien à l'interface de l'environnement et de l'Homme en fait un potentiel indicateur de la contamination du milieu. Bien que cette étude soit basée sur des données diagnostiques de laboratoire, elle met en évidence l'augmentation croissante de l'incidence entre 2008 et 2012, également rapportée chez l'Homme en 2013 et 2014. L'évolution parallèle des indicateurs pour ces périodes souligne l'intérêt de documenter la distribution de la leptospirose canine pour la santé animale et la santé publique. Ces résultats appellent à la vigilance des vétérinaires praticiens et également, des acteurs de la santé publique vis-à-vis de patients à venir, associés à un tableau clinique évocateur de la leptospirose ou non spécifique. La méthodologie d'utilisation des données de laboratoire à des fins de surveillance a donc montré sa pertinence et devrait être utilisée pour perpétuer la production d'indicateurs épidémiologiques dans le futur.



## CHAPITRE 8:

### DISTRIBUTION SPATIALE DU RISQUE LEPTOSPIROSIQUE CHEZ DES ANIMAUX DOMESTIQUES, (BOVIN, CHIEN ET PORC) APPROCHE BAYÉSIENNE

La surveillance des leptospiroses animales à partir des données de laboratoire pâtit de nombreux biais (*cf.* chapitre 7) qui limitent notre connaissance de l'épidémiologie. L'environnement et le climat sont rapportés comme ayant un effet sur le risque d'exposition de l'Homme (Bharti *et al.*, 2003; Levett, 2001) cependant le risque attribuable à ces facteurs est difficilement quantifiable à cause de l'effet probable d'autres facteurs non rapportés. Dans les régions tempérées comme la France où le climat et l'environnement sont peu contrastés par rapport à d'autres régions, la mise en évidence de leurs effets est d'autant limitée; ils ne sont donc pas utilisés pour estimer le risque d'exposition. La prise en compte de ces effets pressentis permettrait d'améliorer notre connaissance du risque leptospirosique en France.

Afin de compléter nos connaissances sur la distribution spatiale du risque leptospirosique chez les animaux domestiques, un indicateur de risque au niveau départemental (*i.e.* ratio d'incidence standardisée) a été conçu puis estimé à partir d'une méthode combinant des données diagnostiques, climatiques et environnementales d'une part et une approche bayésienne d'autre part. Ces travaux ont fait l'objet d'un article scientifique dont le texte est intégralement rapporté dans ce chapitre avant une soumission ultérieure.

Spatial Distribution of the Leptospirosis Occurrence Risk  
in domestic animals in France: results from surveillance

Florence Ayral<sup>a,b,\*4</sup>, Dominique J. Bicout<sup>c</sup>, Helena Pereira<sup>b</sup>,

Marc Artois<sup>a,b</sup>, Angeli Kodjo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Université de Lyon, VetAgro Sup, USC 1233, PERS, F-69280, MARCY L'ETOILE*

<sup>b</sup>*Université de Lyon, VetAgro Sup, Wildtech, F-69280, MARCY L'ETOILE*

<sup>c</sup>*Biomatématiques et Epidémiologie, EPSP-TIMC, UMR CNRS 5525, UFJ, VetAgro Sup, F-69280,  
MARCY L'ETOILE*

---

---

<sup>4</sup> \*Corresponding author. Tel.: +33 (0)478 87 39 16

E-mail address: florence.ayral@vetagro-sup.fr (F. Ayral)

## Abstract

A retrospective study was conducted to identify and to describe the spatial pattern of leptospirosis occurrence risk in dogs, cattle and pigs, in France and to evaluate if this spatial pattern could suggest sources of infections. The study population consisted of the domestic animals clinically suspected of leptospirosis and tested at the “Laboratoire des Leptospires” (Lyon) between 2008 and 2011. The laboratory database was searched for records of dogs, cattle herds and pig herds in which *Leptospira* Microagglutination Tests seroreactivity was consistent with a recent or current infection during the study period.

Five hundred and eleven dogs, 394 cattle herds and 66 pig herds identified as leptospirosis cases were used in a combination of a Bayesian approach and a generalized linear model to produce smooth standardized incidence ratio (sSIR) mapping, based on the relevant environmental and meteorological covariates. There were no significant positive correlation ( $P>0.05$ ) between the spatial distribution of the sSIR in the three animal species and their respective population which suggested that the sources of *Leptospira* infection would not mainly come from conspecies carriage. It appears that the investigated environmental and meteorological indicators also suggested a potential effect on the risk.

The spatial pattern of risk provided a baseline for upcoming surveillance of leptospirosis and described an approach to define the “departements” at higher risk requiring a sharp vigilance in animal and human health.

Key words: Bayesian; Leptospirosis; Smoothed Standardized Incidence Ratio; Domestic animals; Surveillance.

---

## 1. Introduction

Leptospirosis is a disease infecting humans, domestic and wild mammals. It is an issue of global importance because of a worldwide spread and a potentially fatal condition in humans. France is the most affected country within Western Europe (WHO, 1999) and the incidence remains constant with 300 annual clinical cases (Picardeau, 2011). In domestic mammals, leptospirosis is a common disease which has different ways of expression, ranging from sub-clinical to severe infections (Vijayachari *et al.*, 2008). Infected dogs and livestock are a public health concern because of the high probability for humans to be infected by them (Rojas *et al.*, 2010; Cowie and Bell, 2012). Furthermore, leptospirosis in cattle and pigs entails significant economic losses.

The pathogenic agents of leptospirosis are bacteria from the genus *Leptospira*, namely *Leptospira interrogans*, *sensu lato* (Euzéby, 2009). There are over 300 pathogenic serovars gathered into antigenically related serogroups.

The maintenance hosts are usually healthy carriers of at least one serogroup which is maintained by chronic infection of the renal tubules and is shed in urine (Monahan *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2010). Leptospirosis is transmitted to mammals by direct contact of abraded skin or mucous membranes with contaminated urine, wet soil, food, or water which may remain infectious for weeks to months depending on environmental criteria as humidity, temperature, UV and pH (Levett, 2001). Infected animal may be accidental host for a serogroup and maintenance host for others which implies limits to define the serogroup actually involved in the disease; and thus, to develop an appropriate prevention.

The general objective of our work was to improve the prevention of leptospirosis in humans and in domestic animals (DA: the species concerned are dogs, cattle and pig herds) by providing a spatial risk analysis and by suggesting leptospirosis transmission determinants. To investigate the role of DA in infections, we evaluated the degree of overlap between the distribution of the risk and that of the respective population. We assumed that the independency between the spatial distribution of the risk and the DA population is a proxy of the exogenous source involvement: exogenous maintenance host species or indirect transmission factors. By modeling the risk level with environmental and meteorological covariates we wanted to suggest their respective contribution to the prevalence (Lau *et al.*, 2012).

For this purpose, we analyzed the Microagglutination Test (MAT) reactivity in DA recorded by the national reference laboratory (LdL), in France. We aimed at assessing environmental and meteorological indicators which could support the spatial pattern of the standardized incidence ratio (SIR) in the three targeted species. We used a combined Bayesian and a Generalized Linear Model (GLM) approach to analyze data reported during the period between 2008 and 2011.

## 2. Methods

### 2.1 Data source

For the purpose of this study, a leptospirosis occurrence was defined as a current or recent infection by *Leptospira* based on MAT result interpretations. The MAT is a semi-quantitative method to assess the sero-reactivity, it provides the titer of each tested serovar which is the highest serum dilution causing agglutination of 50% of the reference strains. An occurrence was considered when at least one titer was above the cut-off. In dogs, results registered by LdL as “vaccination artifact” were excluded; for the others, regardless of the date of vaccination, a threshold  $\geq 1:640$  ( $\geq 1:400$ )<sup>5</sup> was used as a cut-off for a positive result (Sykes *et al.* 2011), excepted for the canicola, copenhageni and icterohaemorrhagiae serovars for which the cut-off were higher ( $\geq 1:1,280$  or  $\geq 1:800$ )<sup>1</sup> to minimize confounding associated with unexpected vaccinations. In livestock a threshold  $\geq 1:400$  was used as a cut-off for a positive result (André-Fontaine *et al.* 2010). The serovars tested in each DA are detailed in Table 1. The results were routinely registered in an Access database and we collected the following outputs: the species, the year of analysis, the postcode of the owner (or the veterinary practitioner if the owner’s postcode was missing) and the titers resulted from the tested serovars.

### 2.2 Area description and demographic data

This study was limited to the territory of France (overseas territories called DOM TOM excluded) which is divided in 96 administrative units, called “département” (French legal term). For the purpose of this article, we used the “département” as the spatial unit for analysis. Map of the country and boundary lines of administrative “départements” were provided by the

---

<sup>5</sup> The dilution method has changed in 2010



“Institut National de l’Information Géographique” (GEOFLA® Département, <http://professionnels.ign.fr/geofla>).

Based on the fact that the human population is proportional to the dog abundance, we assumed that it was a reliable indicator for the dog population itself and used it as the reference population in dogs. Human population per “departement” was provided by the “Institut National des Statistiques et des Etudes Economiques” (<http://www.insee.fr/fr/ppp/bases-de-donnees/recensement/populations-legales>). The number of cattle and pig herds per “departement” was provided by the French Ministry of Agriculture (<http://accres.agriculture.gouv.fr/disar/faces/>).

### 2.3 Variables

Four environmental covariates: the distribution of the forests ( $x_{1,i}$ ), the distribution of the farming plots ( $x_{2,i}$ ), the distribution of the water bodies ( $x_{3,i}$ ) and the average pH of the soil ( $x_{4,i}$ ), were considered as potential land cover risk factors for leptospirosis transmission (Zaitsev *et al.* 1989; Lau *et al.*, 2012; Raghavan *et al.* 2012). The first three covariates were calculated as, respectively, the surface percentage of forests, farming plots and water bodies throughout the “departement”. The coverage of forests, farming plots and water bodies were provided by Corine Land Cover (<http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/donnees-ligne/>).

The average pH of the soil was provided by the “Groupement d’Interêt Scientifique Sol” (<http://bdag.gissol.fr/geosol/index.php>).

Two meteorological covariates were considered from previous investigations (Ward *et al.*, 2002 a; Boqvist *et al.*, 2012). The annual rainfall ( $x_{5,i}$ ) per “departement” were averaged over the four year study (2008-2011) and were considered as predisposing indicators. The annual minimum temperatures ( $x_{6,i}$ ) per “departement” were averaged over the same period and were considered as indicators of the *Leptospira* survival since the bacteria are inactivated at low temperatures. Both variables were provided by Meteo-France (<http://www.meteofrance.com/climat/france>). The subscript “i” in the covariates ( $x_{k,i}$ ) as defined above stands for the “departement” index with  $i = 1, \dots, 96$ .

### 2.4 Statistical analysis

The spatial analysis of leptospirosis occurrence relative risk was based on the standardized incidence ratio ( $SIR_{i,sp}$ ), defined as  $SIR_{i,sp} = \frac{Y_{i,sp}}{E_{i,sp}}$ , and calculated as follows. First, for each animal species «sp»

(sp = dog, cattle or pig) and «i» “departement” ( $i = 1, \dots, N$ ), the reported data of the annual number of leptospirosis occurrences  $y_{t,i,sp}$  ( $t = 1^{st}, \dots, 4^{th}$ ) were cumulated to form the number of occurrences over the 4 year study period as  $Y_{i,sp} = \sum_{t=1}^4 y_{t,i,sp}$ . We assumed that  $Y_{i,sp}$  can be described as a Poisson variable with intensity parameter,

$$\lambda_{sp} = \frac{\sum_{i=1}^N Y_{i,sp}}{\sum_{i=1}^N S_{i,sp}},$$

where  $S_{i,sp}$  was the “sp” population per “departement”, and the number of expected occurrences under the homogeneous hypothesis was,  $E_{i,sp} = \lambda_{sp} S_{i,sp}$ . The smoothed and estimated  $SIR_{i,sp}$ , were computed like in Bicout *et al.* (2006) following the model,

$$\log(SIR_{i,sp}) = -\log(E_{i,sp}) + \alpha_i + u_i + v_i \quad (1).$$

The model takes into account the overall random effect  $\alpha_i$  of the  $SIR_{i,sp}$  and incorporates both uncorrelated heterogeneities  $v_i$  of each “departement” and spatial correlation  $u_i$  between the “departements”. The software WinBUGS was used for Markov chain Monte Carlo simulations to find Bayesian estimates of  $SIR_{i,sp}$ . The smoothed SIR ( $SIR^*_{i,sp}$ ) was obtained from (1). Then, we have constructed a GLM relating  $SIR^*_{i,sp}$  with environmental and meteorological explanatory variables. The variables included were independent based on the Pearson’s coefficient and the  $\alpha$  level of *p-value* ( $P$ ) to reject independency was  $P < 0.001$ . We used the following model,

$$\log(\langle SIR^*_{i,sp} \rangle) = \beta_0 + \sum_{k=1}^n \beta_k x_{k,i} + \sum_{k=1}^{n-1} \sum_{l=k+1}^n \beta_{k,l} x_{k,i} x_{l,i} \quad (2)$$

where  $\langle SIR^*_{i,sp} \rangle$  was the mean smoothed SIR,  $\beta_0$  was the intercept,  $x_{k,i}$  was the  $k^{th}$  ( $k = 1, \dots, 6$ ) variable and,  $\beta_k$  and  $\beta_{k,l}$  ( $l = k + 1, \dots, n$ ) were the GLM parameters associated to the covariates and their second level interactions. From the model (2), the  $z$  (maximum( $Z$ ) = 21) significant covariates and interactions of the second level ( $P < 0.05$ ) were incorporated in a mixed GLM combined with a Bayesian approach as follows,

$$\log(\langle sSIR_{i,sp} \rangle) = u_i + v_i + \beta_0 + \sum_{z=1}^Z \beta_{SD_z} x_{SD_z,i} \quad (3)$$

where  $\langle sSIR_{i,sp} \rangle$  was the mean smoothed  $SIR^*_{i,sp}$ ,  $x_{SD_z,i}$  was the normalized variables (value divided by the standard deviation,  $x_{SD_z,i} = \frac{x_{z,i}}{SD_z}$ ) with  $\beta_z = \beta_{SD_z} * SD_z$ . The prior  $SIR^*_{i,sp}$  distribution was used in the Bayes relation (Markov chain Monte Carlo simulations) to obtain posterior

distributions  $\langle sSIR_{i,sp} \rangle$  and its 95% credible interval. Only the upper bound values were considered for further analysis.

We used a Pearson's correlation test to investigate the correlation between the distribution of the risk and the population. The null hypothesis was  $r = 0$  (no correlation), with  $r$ , the Pearson's coefficient and the  $\alpha$  level of  $p$ -value ( $P$ ) to reject null hypothesis was  $P < 0.05$ .

All statistical analyses were performed with R software version 2.14.2 and the public domain software package WinBUGS (Cambridge, UK) was used for the Markov chain Monte Carlo simulations.

## 2.5 Mapping

All spatial distributions of risk were analyzed with a descriptive approach, based on the mapping of three risk levels. The risk levels were defined as follows: for each DA "sp", a "departement" "i" was classified as a low, middle or high risk when respectively,  $sSIR_{i,sp} < m - se$ ,  $m - se \leq sSIR_{i,sp} < m + se$ , or  $sSIR_{i,sp} \geq m + se$ , where  $m$  is the average of  $sSIR_{i,sp}$  of all "departements" and  $se = 1.96 \sqrt{\frac{\sigma^2}{96}}$  the 95% confident interval of the standard error with  $\sigma^2$  the standard deviation of  $sSIR_{i,sp}$ .

To obtain a mapping of the occurrence risk in all DA combined, we defined a relative risk ( $RR_i$ ) of  $sSIR_i > 1$  as follows,

$$RR_i = \left[ \frac{\sum_{sp=1}^3 q_{i,sp} \times \text{Prob}(sSIR_{i,sp} > 1)}{\sum_{i=1}^{96} \sum_{sp=1}^3 q_{i,sp} \times \text{Prob}(sSIR_{i,sp} > 1)} \right] / \left[ \frac{\sum_{sp=1}^3 q_{i,sp}}{\sum_{i=1}^{96} \sum_{sp=1}^3 q_{i,sp}} \right] \quad (4),$$

where  $\text{Prob}(sSIR_{i,sp} > 1)$  is the probability to observe more leptospirosis occurrences than expected for the "sp" species and for the "i" "departement", and  $q_{i,sp}$  is the proportion of the "sp" species per "departement". We can notice that  $\sum_{i=1}^{96} q_{i,dog} = \sum_{i=1}^{96} q_{i,cattle} = \sum_{i=1}^{96} q_{i,pig} = 1$ , then  $\sum_{i=1}^{96} \sum_{sp} q_{i,sp} = 3$ .

The data were mapped using the GIS software, ArcMap version 9.3 (ESRI).

## 3. Results

We processed the MAT results of 1953 dogs, 2093 cattle herds and 736 pig herds from which, respectively, 511, 394 and 66 positive results were obtained and included in the study.

### 3.1 Models

The Pearson correlation coefficient was calculated and tested<sup>6</sup> on pairs of the followed six variables: the distributions of the forests, farming plots and water bodies, the pH of the soil, the annual minimum temperatures and the annual rainfall, to check their independency. The pH of the soil and the annual rainfall were correlated ( $P=10^{-6}$ ) and were not incorporated in a same model. Although distributions of the forests and farming plots were correlated ( $P=10^{-6}$ ), we kept them because they were significant when included in the cattle model (2). Other variables were independent from each other ( $P \geq 0.001$ ).

Table 2 reports the model (3) coefficients of the selected variables which were significant once incorporated in the model (2). In dogs, the annual minimum temperatures and annual rainfall were relevant to explain the  $sSIR_{i,dog}$ . Furthermore, the rainfall had the main impact on the increased risk. In cattle, the interaction between the distribution of the forests and farming plots was the most important variable in the  $sSIR_{i,cattle}$  model. In pigs, the percentage of water and the interaction between temperatures and farming plots contributed to explain the increased risk.

### 3.2 Distribution of the leptospirosis occurrence risk

From the model (3), three risk values were assigned to each “departement”, respectively in dogs, cattle and pig herds. The parameters of the distribution reported in Table 3 show that the mean risk had the same order of magnitude in the three DA, from 1.59 to 3.53; nearly half (50% to 61%) of the “departements” had a lower risk whereas around a third (21% to 34%) had a higher risk. Although the results from Table 3 underlines similarities between the three DA, the distribution displayed in Fig.1 reveals a difference of the  $sSIR_{i,sp}$  scales. Indeed,  $sSIR_{i,dog}$  values were not as contrasted than  $sSIR_{i,cattle}$ , and  $sSIR_{i,pig}$ , based on the following maximum values,  $\max(sSIR_{i,dog}) = 6$ ,  $\max(sSIR_{i,cattle}) = 31.3$ , and  $\max(sSIR_{i,pig}) = 21.3$ .

The spatial distributions of the three risk levels are displayed in Fig.2. In each DA, the spatial distribution of the risk was heterogeneous and did not follow the distribution of their respective population. These observations

---

<sup>6</sup> the null hypothesis was  $r = 0$  (no correlation), with  $r$ , the Pearson's coefficient, the  $\alpha$  level of  $p$ -value ( $P$ ) to reject null hypothesis was  $P < 0.001$

were supported by the results from the correlation tests performed between the  $sSIR_{i,sp}$  and the population ( $S_{i,sp}$ ), in Table 4. Indeed, the  $sSIR_{i,dog}$  and the  $sSIR_{i,pig}$  were not correlated to their respective population. Furthermore,  $sSIR_{i,cattle}$  was negatively correlated to the number of cattle herds per “departement” ( $P<0.05$ ).

Regarding temporal analysis, four relevant “departements” based on a high risk level for at least one DA were analyzed at the year scale and displayed in Fig. 2. The time distribution was heterogeneous from a “departement” to another within the same animal species and from an animal species to another within the same “departement”. No obvious trends were observed.

### 3.4 Distribution of the zoonotic risk

For all DA combined, the distribution of the relative risk (RRi (4)) is displayed in Fig.3 and shows that the risk was globally heterogeneous whereas there were two large areas with a higher relative risk: the West of France and the Centre-East. In the two areas, the livestock was mainly responsible of the higher risk. Some scattered “departements” as the “Nord”, the “Haute-Garonne”, the “Var” and others had a higher risk which was mainly related to the dog impact. The detailed values of the RRi, the probabilities to observe more cases than expected and the distributions of animal species are reported in Table 5 and show that a higher risk relied on a higher  $prob(sSIR_{i,sp}>1)$  value and, or, a higher proportion of some of the DA.

## 4. Discussion

This study described a method for using surveillance data in a risk assessment purpose. It provided risk modeling and mapping of leptospirosis in DA with which hypotheses could be developed on the sources of infections, the effect of environmental and meteorological factors, the potential effect of other risk factors and the at-risk areas for targeted prevention in both DA and humans.

### 4.1 Selection of cases

The cases included in this study were defined according to criteria from the literature (André-Fontaine *et al.* 2010; Sykes *et al.* 2011) in order to select recent or current infections and to prevent false positive results. In this way, some potential occurrences were excluded. Indeed, some chronic

infections may entail a very low amount of antibodies against the bacteria; thus, chronically infected animals may be carrying and shedding *Leptospira* whereas their antibody titers remain under the threshold. It is likely that leptospirosis was not diagnosed in some DA with a mild form of the disease or within the sero-conversion period. Because dogs are widely vaccinated in France, a higher cutoff for serovars contained in the vaccines minimized confounding associated with vaccination at the expense of potentially unvaccinated dogs infected by the serovar icterohaemorrhagiae or canicola. The number of occurrences determined in this study was more likely an underestimate of the actual ones; nonetheless it is a probable non-differential misclassification with a limited impact on the SIR values.

Some samples were excluded because information related to the location was missing which implied a potential loss of occurrences. Most of the samples were subcontracted and came from the veterinary diagnostic laboratories which cover up “Île-de-France”, “Picardie”, “Haute-Normandie”, “champagne-Ardenne”, “Centre” and “Bourgogne” and mainly concern the owners of companion animals living in these regions. The probability of underestimating leptospirosis occurrences was higher across the “departements” related to the above 6 regions which implied their probable misclassification as low risk “departements”.

The samples sent to the LdL were usually submitted after a clinical suspicion, but healthy carriers are reported in dogs and in livestock (Stokes *et al.*, 2007; André-Fontaine *et al.*, 2010). The healthy carriage depends on immunologic predispositions (Monahan *et al.*, 2009) rather than on environmental factors. To that extent, exclusion or inclusion of the healthy carriers was unlikely to be substantial for the risk approach we used in this study.

#### 4.2 *Leptospira* sources

In dogs and pigs, the risk was not correlated to the population abundance. This suggests that the sources of infection would not mainly come from a conspecific carriage. This was previously suggested among dogs in the United States by Ward (2002b) and Stokes *et al.* (2007) as a possible effect of the widely use of bivalent vaccination against the serogroups Icterohaemorrhagiae and Canicola. In France, a similar trend was reported in Renaud *et al.* (2012) who suggested that some serogroups considered uncommon so far are more and more incriminated as being the cause of clinical leptospirosis. If the effect of vaccination could partly explain the

emergence of new *Leptospira* serovars in dogs, the effect must be different in pigs in which vaccination is scarce. This underlines that vaccination might indirectly selects sources of infection as well as other factors; the prevalence of *Leptospira* carriage in wildlife, land cover, climatic factors or exposure of DA to *Leptospira* serovars may be of importance in the epidemiology drivers of DA leptospirosis. The range of *Leptospira* serovars is large compared to the one which can be included in vaccines. The limited protection provided by vaccines make them overwhelmed after a while by changes in the distribution of the serovar involved. The vaccines should be regularly adapted to remain efficient and further knowledge on the transmission determinants, and more specifically the predictable ones, may allow foreseeing the turnover of vaccines.

In cattle, the higher risk was correlated to “departements” with a lower number of herds. In France, the “departements” with a small number of herds are the ones with the smallest herd size as well. As a matter of fact, the smaller farms are less intensively controlled and the screenings on diseases are less frequent than in the biggest farms. A lack of disease controls in farms may lead to the spread of *Leptospira* and to higher occurrences; to that extent, the sanitary status of cattle herds could be a confusing factor of the risk. As no information related to the sanitary status of the herd was recorded, deductions could not be extended to their infection origins.

#### 4.4 Environmental and meteorological factors

By including the annual rainfall, the risk modeling in dogs is consistent with Ward (2002a) who reported a lag period of 3 months between the rainfall and its potential impact on leptospirosis prevalence. Indeed, it is likely that the effect of flood land on the bacteria survival, of vegetation growth on wildlife maintenance host abundance and of the incubation period would shift the leptospirosis occurrences from the rainfall periods. In our survey, the rainfall values were averaged over the four year period. In doing so, the lag was smoothed which made the average meteorological values reliable indicators of the risk. This suggests that in temperate countries like in France, the local climate conditions are important to define the prevalence of *Leptospira* infections and may bring new infected areas.

In cattle, the indicators used to explain and to model the risk were environmental rather than meteorological. The potential effect of climatic variables may be confused with the one of herd management (indoor *vs*

outdoor). In the same way, the confusing effect of pig herd management would explain the influence of lower temperatures on the increased risk, knowing that in France, pig herds are mainly kept indoors. Whereas low temperatures are known to inactivate the *Leptospira*, cold periods limit food opportunities for wildlife, especially for maintenance hosts which, in search of food, may be attracted inside farm settlements, causing the spread of the disease in livestock.

#### 4.4 Other epidemiological drivers

The risk mapping allows actors of health policy to increase vigilance in at-risk areas; otherwise it improves risk-based surveillance accuracy by providing assumptions on the epidemiological drivers. Our study described a heterogeneous spatial pattern of at-risk areas among the three animal species. It appears that patterns are different in time and space. Beyond the different environmental and meteorological risk factors, the different spatial distributions of the disease could be explained by different sources and different exposures among DA species. Because we found that dogs, pigs and cattle probably, are accidental hosts mainly infected by exogenous sources of *Leptospira*, the epidemiology in DA and humans might be similar in some respects. Faine (1994) has defined 3 main drivers of human leptospirosis: occupational factors in temperate climates, climatic or environmental factors in tropical climates and urban environment with poor sanitary conditions. His approach underlined the lesser impact of environmental and climatic factors in temperate climates compared to the exposure factors or poor hygiene conditions. In the same way, some epidemiological patterns based on dog use or herd management and areas or herds with poor sanitary status could lead to DA leptospirosis distribution in temperate climates. Although environmental and climatic indicators are relevant to explain spatial distribution of cases, other factors as herd management, dog use or sanitary status should be taken into account in temperate climate countries like in France.

#### 4.5 Higher risk areas

As part of an advanced approach focused in improving leptospirosis preparedness, we used an original way to consider the relative risk of animal and human exposure to DA leptospirosis. The relative risk related to all DA combined included the weighted probability of at-risk “departement” in which the probabilities of being at-risk, respectively in dogs, cattle and pigs were assigned a weight based on the distribution of



the animal species. In doing so, the “departements” with higher risk relied on a higher probability to observe more cases than expected and, or, on a higher proportion of some of the three animal species. This is a comprehensive approach because dogs, cattle and pigs are the main DA species involved in leptospirosis epidemiology. Indeed, cats are not reported to shed *Leptospira* and the impact of other domestic animal species like horses, sheep and goats are unlikely to be significant on the risk compared to the three targeted species. Among the higher risk “departements”, it appears that precautions should be taken towards livestock in many rural areas from West and Centre-East; whereas in the scattered “departements”, wariness should be focused rather on dogs. In these scattered “departements”, many had a higher urban intensity which suggests that canine leptospirosis may be higher in urban areas as it is reported in Raghavan *et al.* (2011). Leptospirosis may be not merely related to rural areas and move towards urban areas as well. Further investigations including additional variables like the accurate location, breed and time spent outdoor could narrow down our first results from surveillance in France.

## Conclusion

This study relies on an opportunistic surveillance of *Leptospira* in domestic animals. It provides baseline data about risk distribution of leptospirosis occurrences in France and suggests that risk may be anticipated based on environmental and meteorological indicators as well as other exposure factors related to animal management or sanitary condition areas. The future of leptospirosis surveillance is based on reliable predictive indicators and required new field investigations to accurately define what the reservoirs are. Advanced screening tests are also required from which genomospecies detection would offer new perspectives.

This study, as part of a comprehensive risk assessment should improve the prevention measures in a typical context of a “one health” approach.

## Conflict of interest

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

## Abbreviations

UV: Ultra-Violet; DA: Domestic Animal; GLM: Generalized Linear Model; sSIR: smoothed Standardized Incidence Ratio; SIR: Standardized Incidence Ratio; ACVIM: American College of Veterinary Internal Medicine; *P*: p value

## Acknowledgements

This project is supported by the European Commission under the Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnology theme of the 7<sup>th</sup> Framework Program for Research and Technological Development, grant agreement no. 222633, WildTech project WP6 Epidemiology and Risk assessment.

The DGAL (French Ministry of Agriculture) provided the census data for cattle and pig herds.

Dr Marine Hugonnard (VetAgro Sup Lyon) for her support in the dog leptospirosis contents.

## Authors' contributions

FA made substantial contribution to the concept and the design of the study, analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript. DB designed the analytic strategy of the study, interpreted data and revised the manuscript critically for the statistical content. HP was involved in the spatial data analysis and revised the manuscript. MA revised the manuscript for epidemiological contents. AK provided the data from the Laboratoire des leptospires.

## Bibliography

- André-Fontaine, G., Nicholas, D., Scalzo, B., Keta, A., Nanjiani, I.A., 2010. Prévalence sérologique de la leptospirose à *Leptospira* sérovar hardjo chez les bovins femelles adultes en France en 2004. Bulletin des GTV (55): 67-74.
- Bicout, D.J., Carvalho, R., Chalvet-Monfray, K., Sabatier P., 2006. Distribution of equine infectious anemia in horses in the north of Minas Gerais State, Brazil. Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 18 (5): 479-482.
- Boqvist, S., Eliasson-Selling, L., Bergström, K., Magnusson, U., 2012. The association between rainfall and seropositivity to *Leptospira* in outdoor reared pigs. The Veterinary Journal 193 (1): 135-139.
- Cowie, G., Bell, A., 2012. A retrospective review of notified human leptospirosis cases in the Waikato region of New Zealand, 2004 to 2010. The New Zealand medical journal 125 (1358): 20-28.
- Euzeby, JP., 2009. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire: *Leptospira*. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/Leptospira.html> (accessed 15 March 2013).
- Lau, C.L., Clements, A., A.C., Skelly, C., Dobson, A.J., Smythe, L.D., Weinstein, P., 2012. Leptospirosis in American Samoa-estimating and mapping risk using environmental data. PLoS neglected tropical diseases 6 (5): e1669. doi:10.1371/journal.pntd.0001669.
- Faine, S., 1994. *Leptospira* and leptospirosis. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews 14 (2): 296-326. doi:10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
- Levett, P.N., 2003. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. Clinical Infectious Diseases 36: 447 – 452.
- Monahan, A.M., Callanan, J.J., Nally, J.E., 2009. Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. Veterinary Pathology 46 (5): 792-799. doi:10.1354/vp.08-VP-0265-N-REV.
- Picardeau, M., 2011. Rapport Annuel d'Activité CNR Leptospirose. Année 2006 à 2010.

- Raghavan, R.K., Brenner, K.M., Higgins, J.J., Van der Merwe, D., Harkin, K.R., 2011. Evaluations of land cover risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002 – 2009). *Prev. Vet. Med.* 101 (3 – 4), 105 – 109.
- Raghavan, R.K., Brenner, K.M., Higgins, J.J., Shawn Hutchinson, J.M., Harkin, K.R., 2012. Evaluations of hydrologic risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002 – 2009). *Prev. Vet. Med.* 107 (1 – 2), 105 – 109.
- Renaud, C., Andrew, S., Djelouadji, Z., Lecheval, S., Corrao-Revol, N., Buff, S., Demont, P., Kodjo, A., 2012. Prevalence of the *Leptospira* serovars bratislava, grippityphosa, mozdok and pomona in French dogs. *Veterinary journal* (8). doi:10.1016/j.tvjl.2012.10.002.
- Rojas, P., Monahan, A.M., Schuller, S., Miller, I.S., Markey, B.K., Nally, J.E., 2010. Detection and quantification of leptospire in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 29 (10): 1305-1309. doi:10.1007/s10096-010-0991-2.
- Stokes, J.E., Kaneene, J.B., Schall, W.D., Kruger, J.M., Miller, R.A., Kaiser, L., Bolin C.A., 2007. Prevalence of serum antibodies against six *Leptospira* serovars in healthy dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 230 (11): 1657-1664. doi:10.2460/javma.230.11.1657.
- Sykes, J.E., Hartmann, K., Lunn, K.F., Moore, G.E., Stoddard, R.A., Goldstein, R.E., 2011. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25 (1): 1-13. doi:10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x.
- Victoriano, A.F.B., Smythe, L.D., Gloriani-Barzaga, N., Cavinta, L.L., Kasai, T., Limpakarnjanarat, K., Ong, B.L., 2009. Leptospirosis in the Asia Pacific Region. *BMC Infectious Diseases* 9 (1): 147. doi:10.1186/1471-2334-9-147.
- Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Shriram, A.N., 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of biosciences* 33 (4): 557-569.
- Ward, M.P., 2002. Seasonality of canine leptospirosis in the United States and Canada and its association with rainfall. *Prev. Vet. Med.* 56: 203-213.
- Ward, M.P., 2002a. Clustering of reported cases of leptospirosis among dogs in the United-States and the Canada. *Prev. Vet. Med.* 56: 215 – 226.

Ward, M.P., Glickman, L.T., Guptill, L.E., 2002b. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). J. Am. Vet. Med. Assoc. 220 (1): 53-58.

WHO. 1999. Leptospirosis worldwide. 74 (29): 237-244.

Zaitsev, S.V., Chernukha, I.G., Evdokimova, O.A., Belov, A.S., 1989. Survival rate of *Leptospira pomona* in the soil at a natural leptospirosis focus. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii (2): 64-68.

## Tables

**Table 1 - *Leptospira* serogroups investigated (x) at the “Laboratoire des Leptospires” – Lyon depending on the animal species concerned.**

Serogroups	Dogs	Cattle	Pigs
Autumnalis	x	x	x
Australis	x	x	x
Bataviae		x	x
Grippotyphosa	x	x	x
Ballum			x
Icterohaemorrhagiae	x	x	x
Grippotyphosa	x	x	x
Hardjo	x	x	x
Panama	x	x	
Pomona	x		x
Pyrogenes	x		
Tarassovi			x

**Table 2 - Contribution of each covariate in sSIRi,sp based on the non-normalized coefficients ( $\beta_z = \beta_{SD_z} * SD_z$ ) of the z covariates involved in each model (3), the standard deviations ( $SD_z$ ), the annual minimum temperatures is called “Temperatures”.**

		Coefficients $\beta_z$						
		Intercept	Distribution of farming plots (PFP)	Distribution of forests (PF)	Distribution of water	Temperatures (YMT)	Annual Rainfall	Interaction PFP: PF
SD <sub>k</sub>		23.6	13.5	0.6	1.7	170.8	577	190
Models								
sSIRi,dogs	-2.38	-	-	-	0.31	1.98	-	-
sSIRi,cattle	-3.05	0.002	-2.57	-	-	-	15.6	-
sSIRi,pigs	2.51	-10.6	-	0.22	-2.07	-	-	20

**Table 3 - the 95% confident interval (CI) boundaries of the mean  $sSIR_{i,sp}$  used to define the low, middle and high risk “departements” in Fig.1-2, the proportion of the “departements” involved in each class was calculated from the Area Under the Curve in Fig.2.**

	Low	Middle	High
$sSIR_{i,dogs}$	< 1.59	1.59 - 2.07	> 2.07
Proportion	50%	16%	34%
$sSIR_{i,cattle}$	< 1.73	1.73 - 3.58	> 3.58
Proportion	61%	18%	21%
$sSIR_{i,pigs}$	< 2.37	2.37 - 3.53	> 3.53
Proportion	54%	20%	26%

**Table 4 - Coefficients and the p values from the Pearson’s Correlation Tests to assess the correlation between the risk and the population per “departement”, a negative coefficient with a  $P \leq 0.05$  supports that leptospirosis occurrence risk is significantly encountered in the “departements” with a low population whereas a negative coefficient with a  $P > 0.05$  supports that leptospirosis occurrence risk is not related to the population.**

	Human population	Cattle herds	Pig herds	p-value
$sSIR_{i,dog}$	-0.08	-	-	0.5
$sSIR_{i,cattle}$	-	-0.2	-	0.05
$sSIR_{i,pig}$	-	-	-0.08	0.5

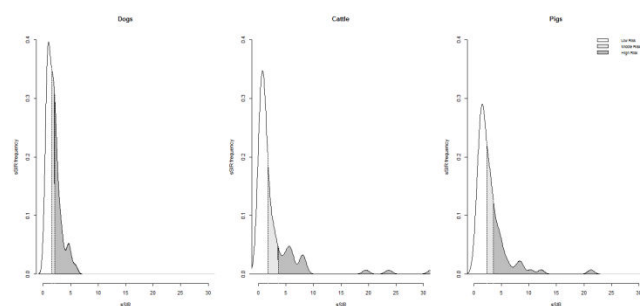
**Table 5 - Values of the relative risk ( $RR_i$ ),  
the probability to observe more leptospirosis cases than expected ( $P(sSIR_{i,sp}>1)$ )  
and the proportion of DA ( $q_{i,sp}$ ) in the “departements” with a higher risk,  
all domestic animal species combined.**

«departement» code	$RR_i$	$P(sSIR_{i,dog}>1)$	$P(sSIR_{i,cattle}>1)$	$P(sSIR_{i,pig}>1)$	$q_{i,dog}$	$q_{i,cattle}$	$q_{i,pig}$
West							
16	1.21	0.163	0.050	0.867	0.006	0.007	0.007
22	1.32	0.786	0.977	0.211	0.009	0.028	0.105
79	1.33	0.473	0.001	0.780	0.006	0.011	0.011
72	1.44	0.004	0.039	0.896	0.009	0.012	0.019
37	1.65	0.591	0.638	0.269	0.009	0.003	0.005
86	1.78	1.000	0.047	0.249	0.007	0.003	0.005
56	2.33	0.994	0.154	0.866	0.011	0.024	0.061
49	2.38	0.659	1.000	0.445	0.012	0.021	0.019
29	2.83	0.378	0.660	0.987	0.014	0.023	0.086
85	3.19	0.959	1.000	0.924	0.010	0.016	0.014
44	3.31	1.000	1.000	0.995	0.020	0.025	0.013
Centre-East							
10	1.06	0.008	0.647	0.855	0.005	0.001	0.002
88	1.07	0.074	0.502	0.079	0.006	0.013	0.004
21	1.13	0.068	1.000	0.106	0.008	0.005	0.005
89	1.22	0.049	0.831	0.422	0.005	0.003	0.005
18	1.25	0.020	0.651	0.483	0.005	0.005	0.004
1	1.83	0.795	0.626	0.285	0.009	0.009	0.011
3	1.85	0.014	0.973	0.077	0.005	0.021	0.012
58	2.08	0.629	0.749	0.337	0.004	0.013	0.005
70	2.19	0.473	0.986	0.101	0.004	0.009	0.004
69	2.34	1.000	0.070	0.370	0.027	0.010	0.005
71	2.54	0.766	1.000	0.116	0.009	0.027	0.010
Scattered « departements »							
40	1.21	0.813	0.010	0.026	0.006	0.003	0.005
66	1.43	0.620	0.024	0.012	0.007	0.001	0.002
82	1.49	0.912	0.017	0.448	0.004	0.004	0.002
30	1.55	0.612	0.044	0.053	0.011	0.001	0.003
62	1.56	1.000	0.001	0.136	0.023	0.012	0.020
59	1.82	1.000	0.102	0.068	0.041	0.012	0.027
47	1.86	0.997	0.015	0.704	0.005	0.005	0.003
8	1.91	0.010	1.000	0.103	0.005	0.009	0.003
6	2.08	0.672	0.024	0.002	0.017	0.000	0.001
31	2.13	0.998	0.003	0.274	0.020	0.008	0.006
83	3.10	0.998	0.038	0.005	0.016	0.000	0.001

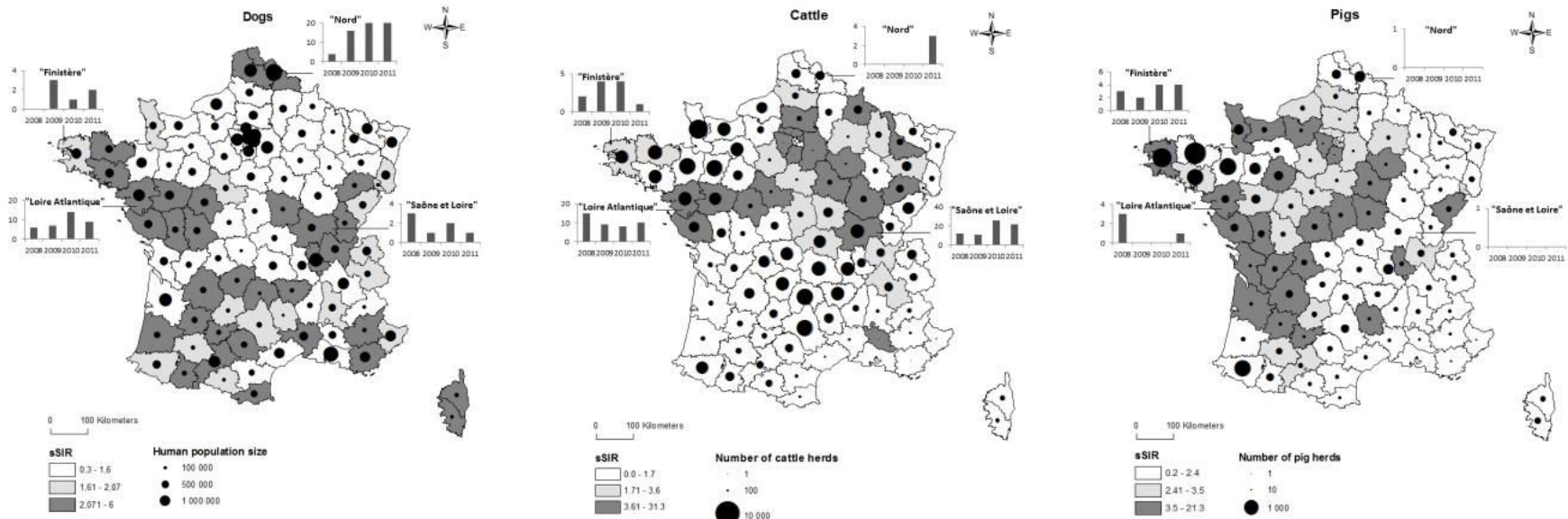


## Figures

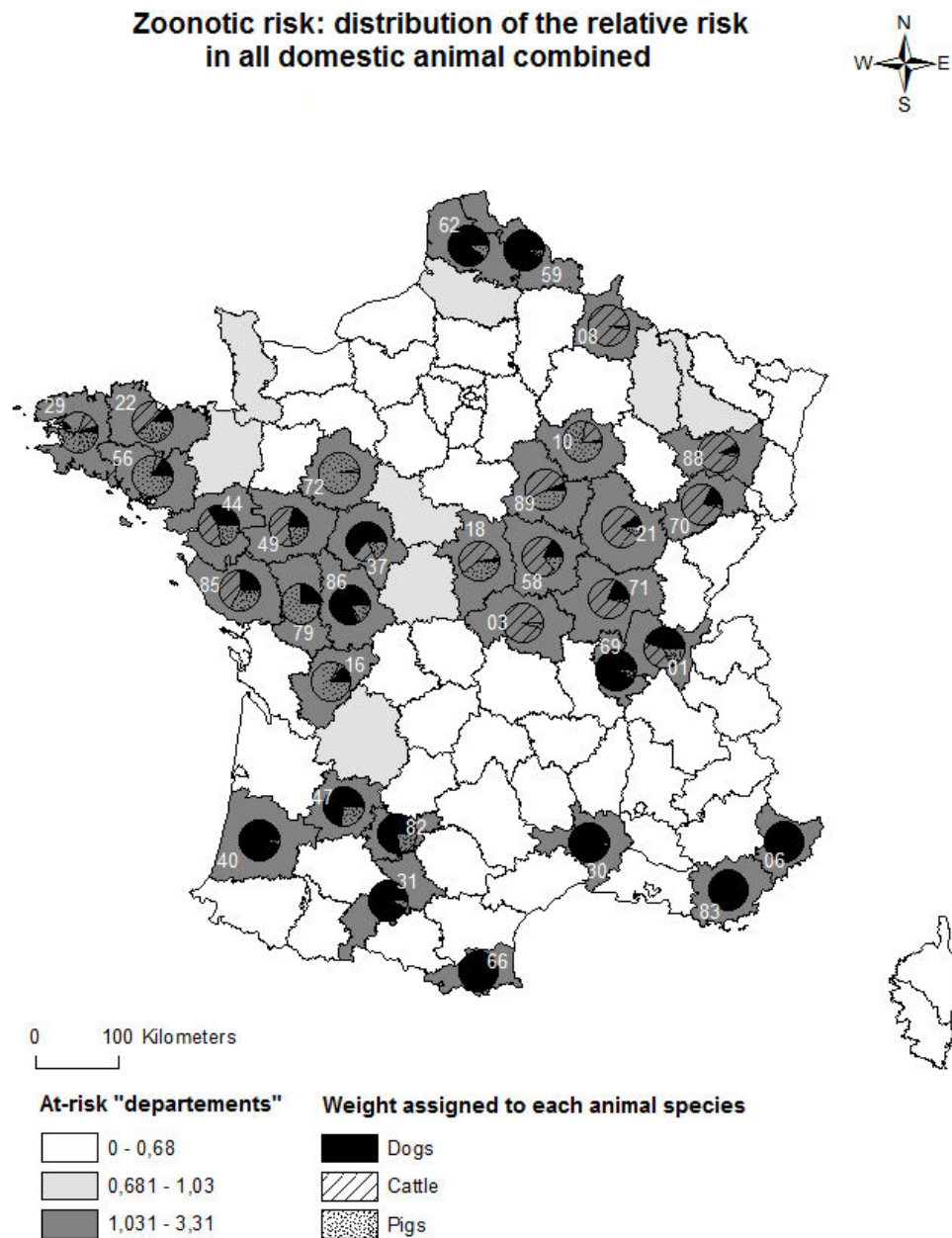
**Figure 1 - the sSIRi.sp density and the distribution of the three classes: low, middle and high risk of leptospirosis occurrences with the sSIRi.sp the indices of leptospirosis occurrence risk for a species “sp”, in a “i” “departement”, the area under the curve quantifies the distribution of the risk classes and are reported in the table 2.**



**Figure 2 - Mapping and comparison of the distribution of the leptospirosis occurrence risk (graduated colors: low “white”; middle “grey”; high “dark grey”) and the population size (full black circles), in the three animal species, as an illustration of the annual distribution of occurrences, some bar plots are figured in four “departements”, the y axis scales may be different from a plot to another.**



**Figure 3 - Mapping of the distribution of the relative risk to observe more leptospirosis occurrences than expected ( $RR_i$ ), all animal species combined (graduated colors: low “white”; middle “grey”; high “dark grey”), a “département” was classified as a low, middle or high risk when respectively.  $RR_i < m - se$ .  $m - se \leq RR_i < m + se$ . or  $sSIR_i \geq m + se$ , where  $m$  is the average of  $RR_i$  of all “départements” and  $se$  the 95% confident interval of the standard error, the pies figure the contribution of the dogs (full dark), the cattle (hatching) and the pigs (dots) in the risk values of “départements” with high risk. The high risk “départements” are numbered with the administrative code reported in Table 5.**



### ***Résumé de la partie III:***

La surveillance de ZAR peut également passer par l'étude de l'infection chez les espèces victimes de ces agents, ou les espèces qui établissent une liaison épidémiologique avec l'Homme. Par exemple, la description de la leptospirose chez les chiens et les bovins peut apporter un reflet de l'exposition directe ou indirecte de l'homme dans les habitats où coexistent ces espèces. Des données de diagnostic de leptospirose animale au laboratoire, ont été utilisées à des fins de surveillance (état des lieux actualisé de la situation épidémiologique en France).

(1) Entre 2008 et 2011, la distribution des sérogroupes a été obtenue chez les chiens (n=232 à l'exclusion des profils vaccinaux) et dans les cheptels bovins (n=394). Les leptospiroses cliniques sont associées à divers sérogroupes suggérant un panel d'hôtes réservoirs au-delà de l'espèce *Rattus*. (2) Sur la période 2008-2012, un indicateur de l'incidence cumulée de la leptospirose clinique canine a été estimée entre 1,3 et 1,5/100 000 chiens-an. Les valeurs annuelles et mensuelles mettent en évidence une augmentation constante des cas cliniques et l'absence d'effet de la saison, respectivement. (3) Chez les chiens, les bovins et les porcins atteints de leptospirose, l'utilisation du ratio d'incidence standardisée, lissé sur des variables environnementales et populationnelles, suggère une distribution hétérogène du risque départemental indépendamment de la distribution des populations animales.

Ces méthodes, toutes basées sur les confirmations diagnostiques par le MAT (test de référence), apportent des informations complémentaires sur la situation épidémiologique de la maladie et peuvent servir à appuyer des décisions de santé publique. Toutefois, les indicateurs et distributions obtenues pâtissent de nombreux biais et leur utilisation pour la surveillance de la leptospirose reste justifiée à défaut d'application largement répandue d'autres méthodes de diagnostic expérimental de la leptospirose.



DISCUSSION – PERSPECTIVES

ET CONCLUSION GÉNÉRALE

## DISCUSSION

Les rats (*Rattus* spp. et *Rattus norvegicus* en particulier) sont réservoirs de nombreuses zoonoses (plus de 25 rapportées dans ce manuscrit) dont la plupart sont des maladies dites « négligées » et sous estimées malgré leur gravité, à l'instar de la leptospirose. Les changements généraux qui s'opèrent actuellement (*e.g.* changements du climat, des échanges, de l'habitat) pourraient être à l'origine de changements de distribution des populations de rats et des zoonoses associées, impliquant une possible augmentation des maladies chez l'Homme et les animaux domestiques. Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux était de documenter l'épidémiologie des ZAR afin d'étudier la faisabilité de la surveillance chez une espèce source (*R. norvegicus*) et chez des espèces cibles, en tant que sentinelles de l'exposition de l'Homme. Les points développés dans notre discussion se situent dans le contexte des actions de santé publique: veille, surveillance, alerte, et prévention.

### **Veille sanitaire des populations de rats (*Rattus norvegicus*)**

La veille sanitaire vise ici, à analyser et actualiser les connaissances sur les risques sanitaires, leurs causes et leur éventuelle évolution afin de détecter prospectivement les facteurs de risque susceptibles d'altérer la santé de l'Homme et des animaux domestiques. Parmi nos travaux, l'échantillonnage de rats (n=178) issus de différentes colonies dans le Rhône et la détection directe des agents zoonotiques circulant ont permis pour la première fois, de déterminer le statut sanitaire des rats sauvages dans cette région. Les méthodes de PCR conventionnelles ont détecté la présence de *L. interrogans* et de l'hantavirus Séoul chez, respectivement 26% (IC<sub>95%</sub>=20% – 33%) et 14% (IC<sub>95%</sub>=8% – 20%) des rats échantillonnés. La présence de ces agents, responsables de morbidité et de mortalité dans le monde et, en France en particulier, qualifie la menace sanitaire des populations murines dans le Rhône.

L'étude de la distribution des rats infectés et non infectés a permis de définir certaines variables socio-économiques comme des indicateurs de risque de portage zoonotique chez le rat. En particulier, la densité croissante de la population humaine et/ou le niveau décroissant des revenus dans un quartier ou un secteur géographique, sont des indicateurs de portage zoonotique plus fréquent chez les rats présents. Le plus faible niveau d'hygiène (*i.e.* entreposage inadéquat des détritux) conduisant au contact entre les rats et la moindre qualité des réseaux d'assainissement favorisant le maintien des agents dans l'environnement, de concert avec d'autres facteurs locaux indéterminés pourraient expliquer le portage accru dans les zones de forte densité humaine et de moindres revenus. Dans la littérature, le faible niveau d'hygiène et la défaillance des infrastructures sont également avancés pour expliquer l'apparition d'épidémie de leptospirose dans les pays en voie de développement (Sarkar *et*

*al.*, 2002). Notre étude suggère donc que ces facteurs restent pertinents dans un pays industrialisé comme la France. Dans le cadre du projet WildTech, un échantillonnage de 130 rats surmulots collectés dans la ville de Liverpool (Angleterre) ont été dépistés par la micro-puce à ADN. Vingt-sept (27) rats étaient porteurs de leptospires et l'analyse de leur distribution spatiale montrait la répartition des *hot spots* (*i.e.* sites où la probabilité de présence d'un rat infecté est significativement plus grande) dans les zones plus densément peuplées et à plus faible revenus (*Cf.* annexe 23). Bien que le lien entre ces indicateurs et le portage ne soit pas clairement établi, leur utilisation reste pertinente pour orienter le choix de sites de surveillance, pour définir les populations à risque accru d'être exposées aux ZAR et pour informer le personnel de santé. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus pourraient être le reflet d'une situation particulière et ponctuelle, non généralisable. Des données supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer ces observations.

La distribution hétérogène des rats infectés par les ZAR, observée dans nos travaux, souligne le besoin d'approfondir la compréhension des mécanismes écologiques et épidémiologiques de persistance des ZAR dans les populations de rats. De ce point de vue, des études longitudinales ciblant un nombre limité de ZAR dans des environnements contrastés apporteraient une masse d'informations propices à la cartographie des zones à risque et donc à la prévention de la contamination des personnes fréquentant ces zones. La difficulté de mise en œuvre de telles études chez les rats sauvages notamment à cause de l'absence de maîtrise possible de nombreux paramètres (par ex. les paramètres environnementaux, l'effectif de la population et sa structure démographique) nous a orienté vers la conception d'un modèle dynamique de persistance de *L. interrogans* au sein de populations de rats. Plus précisément, ce modèle ciblait les populations urbaines et rurales pour lesquelles nous émettons l'hypothèse d'une persistance plus soutenue dans l'habitat urbain où les paramètres écologiques seraient moins fluctuants. Ce modèle permettrait d'estimer les paramètres relatifs à un habitat donné et de tester l'influence de l'environnement dans le contexte de l'Europe de l'ouest. Le climat y étant moins contrasté par rapport aux pays tropicaux d'où sont issus de précédents travaux de modélisation (Holt *et al.*, 2006).

Actuellement, peu de connaissances ont trait au maintien des leptospires dans les populations naturelles, en particulier, à la place relative des voies de transmission directes et indirectes, à la concurrence entre les sérovars, à la transmission de l'infection ou de l'immunité de la mère à la descendance et aux déterminants de la survie des bactéries dans l'environnement. Ce sont autant de connaissances nécessaires à l'élaboration d'un modèle de persistance réaliste. Simultanément à nos travaux de thèse, une thèse universitaire de troisième cycle est actuellement menée par le Docteur



Vétérinaire A-L Zilber sur la dynamique d'infection de *L. interrogans* chez le rat en tant que modèle d'infection chronique. Ces travaux visent entre autres à déterminer des paramètres d'excrétion des bactéries dans l'environnement selon différentes voies d'inoculation. À l'issue de ces études expérimentales, les connaissances complémentaires pourront être incorporées dans le modèle dynamique de persistance cité précédemment, pour permettre l'obtention de résultats plus réalistes dans la détermination des facteurs de maintien des leptospires dans les populations de rats et ainsi mieux définir les populations humaines et animales à risque d'être exposées.

## Surveillance

La surveillance, aussi appelée épidémiosurveillance, correspond à la collecte systématique et continue de données ainsi qu'à leur analyse, leur interprétation et leur diffusion dans la perspective d'aide à la décision.

### *Surveillance des ZAR chez la source (Rattus norvegicus)*

Une partie de nos travaux s'est attachée à l'application de méthodes de détection des ZAR chez les rats du Rhône, dans l'objectif d'évaluer leur intérêt pour la surveillance. Certaines méthodes (*e.g.* PCR, micro-puce à ADN) avaient pour but de produire des données de présence *vs* absence de ZAR alors que d'autres (*e.g.* séquençage massif, MST) produisaient une information qualitative fine de la nature des ZAR avec la caractérisation moléculaire des agents zoonotiques détectés. Si l'ensemble de ces méthodes complémentaires sont utiles pour la surveillance sanitaire, nous discutons ici plus en détail de l'intérêt de la micro-puce à ADN « Rongeurs commensaux », une technologie économiquement plus intéressante que les autres méthodes dans le contexte de la détection multi-pathogène.

À titre indicatif, nous avons évalué les caractéristiques de la micro-puce à ADN pour la détection de *Leptospira* et de l'hantavirus Séoul par rapport à la PCR, tout en soulignant que la PCR n'est pas un test parfait pour la détection de ces agents. À partir de 84 échantillons de rats testés avec les deux méthodes, la micro-puce à ADN a détecté 50% des rats qualifiés « infectés par les leptospires » par la méthode de PCR (Sensibilité=50%, IC<sub>95%</sub>=44% – 55%) et 90% des rats « PCR-négatifs » avaient aussi un résultat négatif par la micro-puce à ADN (Spécificité=90%, IC<sub>95%</sub>=87% – 93%). À partir de la prévalence déterminée par PCR dans l'ensemble de la population échantillonnée (26%, n=178), la valeur prédictive positive de la micro-puce était de 64% et la valeur prédictive négative était de 84%.

L'utilisation de la micro-puce apporte donc une information plus fiable pour prouver la présence de leptospires dans une population de rats (confiance élevée lors de résultats positifs) que pour prouver l'absence de ces agents. Toutefois, la sensibilité de la micro-puce serait en réalité plus élevée car la présence d'ADN leptospirosique dans les échantillons positifs par la micro-puce et négatifs par la PCR a été confirmée dans trois des cinq cas. Le spécimen analysé par la micro-puce incluant le poumon pourrait, dans certains cas, favoriser la détection bactérienne puisque la présence de leptospires dans cet organe a récemment été décrite chez les rats de Lyon (Zilber *et al.*, *In press*). Les caractéristiques de la micro-puce pour la détection d'hantavirus Séoul (Sensibilité=14%, IC<sub>95%</sub>=7% – 21%; Spécificité=100%) soulignaient, pour cet agent également, un intérêt marqué lorsque la confiance en un résultat positif peut être privilégiée au détriment de la confiance en un résultat négatif. Dans le cadre de la surveillance d'agents zoonotiques pour lesquelles les prévalences peuvent être faibles dans certaines colonies, un test sensible est nécessaire pour limiter les résultats faussement négatifs et la sous-estimation des populations de rats infectés. La micro-puce à ADN « Rongeur commensaux » est donc un outil prometteur pour la surveillance, elle peut assurer la production rapide d'une large quantité d'informations sur le statut sanitaire des rats et d'autres rongeurs cependant la qualité des informations fournies dépend de l'amélioration préalable de sa sensibilité.

En outre de la qualité des tests utilisés, l'échantillonnage des rats sauvages est une réelle limite pour la surveillance chez ces espèces. L'accès aux tissus de rats sauvages pour entreprendre des dépistages est limité par leur néophobie qui rend le piégeage fastidieux et chronophage. De plus la mise en place des pièges en milieu urbain se heurte à de nombreuses limites techniques (par ex. contraintes liées aux infrastructures et aux propriétés privées, interventions humaines pour le contrôle des populations de rats et vol de matériel). Les contraintes de terrain et le comportement des rats contribuent à un succès de capture faible. Dans nos travaux, le succès de capture a été évalué sur certains sites urbains (*cf.* Annexe 17), il était de 68 captures/812 jours-piège (0,08 capture/jour-piège) et ce résultat était similaire à une autre étude (Weihong *et al.*, 1999). L'échantillonnage des rats ayant pour objectif la surveillance implique donc des moyens humains et matériels importants, en particulier dans le cadre d'un suivi multi-sites et continu, ce qui est peu adapté à la réalité économique actuelle. Une alternative serait de développer une surveillance événementielle basée sur des rats collectés par un réseau de professionnels (par ex. les entreprises de dératisation, les égoutiers). Ce réseau utilisant les capacités de prélèvement de ces professionnels peut fournir un échantillonnage de convenance qui n'est pas adapté à l'estimation de la prévalence. Cette dernière nécessite des captures intensives dans une zone donnée (Himsworth *et al.*, 2014). En revanche, un échantillonnage de convenance pourrait fournir un matériel biologique de choix dans le but de détecter la présence d'agents pathogènes par des micro-

puces à ADN, telles que celle étudiée dans le cadre du projet WildTech. À moyen terme, la surveillance à la source des ZAR nécessite donc à la fois la création d'un réseau de collecte d'échantillons auprès de professionnels, mais aussi la finalisation de la mise au point des micro-puces à ADN.

Dans le cas particulier des élevages de rats à but commercial ou expérimental, une surveillance devrait être mise en place à leur niveau afin d'assurer l'absence d'agent zoonotique et ainsi fournir une meilleure considération de la santé des populations exposées. Dans cette situation, l'utilisation d'une micro-puce à ADN suffisamment sensible serait appropriée des points de vues sanitaire, logistique et économique.

#### *Surveillance des ZAR multi-hôte, exemple de la leptospirose chez les animaux domestiques*

Nombre de ZAR sont des infections multi-hôtes, si le rat est particulièrement problématique pour la santé publique de par sa proximité avec l'Homme, il n'est pas pour autant la seule espèce impliquée. Pour beaucoup de ZAR, d'autres espèces interviennent dans l'épidémiologie, par exemple les félinés interviennent en tant que réservoir dans le cycle de *T. gondii* et de *R. typhi* (cf. Annexe 1 où sont développés les cycles épidémiologiques). Leurs interactions avec les rats doivent donc être considérées pour une approche intégrative de l'épidémiologie et de l'analyse de risque de présence.

Parmi les ZAR multi-hôtes, la leptospirose est l'une des plus importantes en France continentale et concerne tous les mammifères. La leptospirose chez les animaux domestiques est une maladie difficile à diagnostiquer sans recours aux tests de laboratoire. Nos analyses des données du Laboratoire des Leptospires – Lyon ont montré l'intérêt de fonder pour partie au moins, la surveillance des risques d'exposition humaine sur une surveillance des cas chez les animaux domestiques. En tant qu'espèces à l'interface de l'environnement et de l'Homme, les animaux domestiques peuvent jouer le rôle d'hôte intermédiaire (Gay *et al.*, 2014) ou refléter l'exposition de l'Homme partageant le même habitat.

En pratique, nos résultats suggèrent l'augmentation des leptospiroses canines entre 2008 et 2012, la distribution spatiale hétérogène du risque leptospirosique et l'absence d'effet de la saison sur les indicateurs qui devraient appeler à la vigilance des praticiens vétérinaires vis-à-vis de cette maladie indépendamment du lieu ou de la période. L'analyse des distributions spatiales et spatio-temporelles n'ayant pas été réalisée jusque-là en France, fournit des données et des méthodes sur lesquelles

pourront se baser la surveillance à l'avenir. Cependant, les résultats pâtissent de biais de sélection et de mesure associés à l'utilisation de données enregistrées dans un but diagnostique et non épidémiologique. En outre, les données ne représentent que la sous-population atteinte de formes cliniques or, un portage asymptomatique est décrit tant chez les chiens que chez les bovins (Ellis *et al.*, 1981; Stokes *et al.*, 2007). Un dispositif de surveillance active permettrait de compléter les données issues des résultats de laboratoire et d'améliorer la représentation de la situation épidémiologique. Par exemple, une surveillance basée sur des reins de ruminants dans les abattoirs pourrait, comme dans d'autres pays, produire une estimation de la prévalence de l'infection chez les bovins d'une région ou du pays (Dreyfus *et al.*, 2014; Ellis *et al.*, 1981). Elle permettrait d'étudier de potentiels facteurs de risque comme le système d'exploitation ou la taille de l'élevage, facteurs qui n'ont pas pu être étudiés dans nos travaux. Développer cette surveillance est d'autant plus importante que l'apparition d'un test rapide (WITNESS® Lepto, Zoetis, France) pour le diagnostic de la leptospirose au « pied » de l'animal pourrait réduire le nombre de tests effectués dans les laboratoires de diagnostic et appauvrir l'information épidémiologique qui en est issue.

### **Alerte, analyse des résultats au regard des cas humains**

L'alerte est désignée par un signal, souvent issu de la surveillance, dont l'association à une menace pour la santé des populations a préalablement été considérée et qui nécessite une réponse adaptée. Lors de la mise en place d'une surveillance des ZAR, il est nécessaire de décrire les situations qui doivent faire l'objet de ce signal. Nous mettons ici nos résultats en perspective avec les cas humains rapportés dans le Rhône et plus généralement en France afin d'appréhender, dans la mesure du possible, le risque de transmission de ZAR du rat à l'Homme.

Un bref rappel sur le mode de surveillance des ZAR chez l'Homme en France est apporté pour évaluer plus justement la qualité de ces données à des fins épidémiologiques. Ces maladies sont non spécifiques et leur diagnostic repose essentiellement sur la confirmation par des tests de laboratoire. Sur ces derniers, repose la surveillance passive des ZAR, seule surveillance en place, en France (à l'exception de Toxosurv, surveillance active de la toxoplasmose chez les femmes enceintes). En effet, la majorité des ZAR n'est pas notifiée, il est donc possible que l'état des connaissances et de reconnaissance de ces maladies conduisent à la sous-estimation de la situation épidémiologique en France. Parmi les dispositifs de surveillance de ZAR, la surveillance des hantaviroses est assurée par le CNR des Fièvres hémorragiques virales (Institut Pasteur – Lyon) et la surveillance de la leptospirose, particulièrement développée, centralise les données de certains laboratoires: Biomnis,

Cerba et le CNR des leptospiroses (Institut Pasteur – Paris). Récemment, des cas de ZAR sont apparus de façon fortuite (hantavirose à virus Séoul, Macé *et al.*, 2013) ou à la faveur d'incidents telles que la grève des éboueurs à Marseille (leptospiroses, Socolovschi *et al.*, 2011) cependant la description des circonstances d'apparition des cas n'est pas la règle et l'utilisation des données issues de cette surveillance passive (souvent biaisées par le mode de sélection et incomplète concernant la nature et la localisation de l'exposition) ne permet que partiellement d'identifier les situations à risque d'exposition.

### *Risque de transmission des Hantaviroses*

La FHRS est une fièvre hémorragique virale responsable d'environ 200 000 hospitalisations dans le monde, principalement en Asie. En Europe de l'Ouest, un variant impliquant un tableau clinique modéré de FHRS est largement répandu et est responsable de milliers de cas chaque année en Finlande et également en Allemagne. En France, les cas de FHRS sont essentiellement rapportés dans le nord-est et sont associées au virus Puumala dont le réservoir est le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*). Seuls deux cas d'infection par l'Hantavirus Séoul (SEOV), réservoir *Rattus norvegicus*, ont été rapportés en 2001 et 2012 alors que le virus a été détecté chez des rats dans la région de Lyon en 2004 (Heyman *et al.*, 2004), en 2008 <sup>7</sup> (détection sérologique) et en 2012 (par notre étude). Ces faits démontrent la circulation de SEOV parmi les rats de Lyon depuis une dizaine d'années au moins avec une répercussion limitée sur la santé humaine par rapport à ce qui pourrait être attendu. En effet, SEOV se transmet par les excréta contaminés du rat et peut être véhiculé à la faveur de poussières (Ayrat *et al.*, 2013). Dans ce contexte, il est surprenant que certains environnements (*e.g.* entrées d'immeubles) à Lyon, où la circulation de SEOV chez les rats est désormais connue, ne soient pas associés avec l'apparition de cas humains. En 1994, une enquête sérologique rétrospective sur des cas suggestifs de FHRS en Irlande a rapporté la présence d'anticorps chez 2% des patients et principalement dirigés contre SEOV (McKenna *et al.*, 1994). Une étude similaire en France permettrait de décrire le statut immunitaire actuel de la population face à cet agent et de mieux évaluer les situations à risque d'exposition pour l'Homme.

Dans le contexte sanitaire actuel, impliquant des cas sévères de FHRS associés à SEOV, en France et au Royaume-Uni (Jameson *et al.*, 2013a; Macé *et al.*, 2013), le risque d'introduction et de circulation de souches plus virulentes doit être considéré. Parmi les rats capturés à Lyon, les virus étaient en lien

---

<sup>7</sup> <http://www.pestcontrolmedia.com/img/sciences/SCIENCES-531.pdf> consulté le 10/05/15

avec les souches décrites en Asie et le virus issu d'un rat capturé dans le Parc de la Tête d'Or avait une proximité génétique plus importante avec la souche « Replonge » isolée chez le cas humain apparu en 2012 (Dupinay *et al.*, 2014). La surveillance moléculaire des souches circulant parmi les rats est donc nécessaire pour anticiper une éventuelle émergence de souches plus virulentes en France.

### *Risque de transmission de la Leptospirose*

*Leptospira* est responsable de 500 000 cas dans le monde avec un taux de létalité de 5% à 15% pour les formes classiques (Adler et de la Peña Moctezuma, 2010). La leptospirose est rapportée par l'OMS comme une maladie ré-émergente dans le monde et, en France, l'Institut Pasteur a rapporté une incidence supérieure à celle des dix dernières années (Incidence >1 cas/100 000 pers-an<sup>-1</sup>) en 2013, confirmée en 2014 (Picardeau, 2015).

Le contexte clinique de la leptospirose humaine (infection aiguë et sévère devant être traitée aux antibiotiques) laisse peu d'opportunité d'isoler des souches circulantes (moins de 1% des tests diagnostiques effectués au CNR de la leptospirose). La majorité des tests utilisés sont sérologiques et ne fournissent qu'une image approximative des souches circulant chez l'Homme. La possibilité de comparer les souches isolées chez les rats dans notre étude avec celle de l'Homme était donc limitée. En outre, le respect de l'anonymat des patients et la difficulté de localiser la source de l'infection ne permet pas de mettre en lien les rats infectés observés avec des cas humains possiblement exposés dans notre site d'étude. Toutefois les informations sérologiques rapportent une prédominance du séro groupe Icterohaemorrhagiae chez l'Homme et une augmentation des cas associés au séro groupe Australis (8% des cas en 2011 et 18% des cas en 2012)<sup>8</sup>. L'observation de séro groupes infectants similaires chez les chiens et les bovins d'une part et chez l'Homme d'autre part, porte à supposer que certaines sources seraient également similaires. La prédominance du séro groupe Australis chez les espèces domestiques et son augmentation parmi les cas humains soulignent à nouveau des similitudes épidémiologiques entre ces espèces animales et l'Homme. Les parallèles épidémiologiques entre les leptospiroses humaines et animales suggèrent l'intérêt d'étudier ces dernières pour améliorer la surveillance de la maladie humaine et moins probablement pour décrire le risque de transmission des animaux domestiques à l'Homme dont l'infection est habituellement associée à des hôtes réservoirs. Le manque de connaissances des situations à risque de transmission et des sources d'infections

---

<sup>8</sup> <http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004r-004/ra2012cnrleptosshortv.pdf> consulté le 10/05/15

humaines est essentiellement lié au manque de connaissance des souches circulant. En alternative à ce manque de connaissance et fondée sur la ressemblance de l'épidémiologie canine et humaine, une étude sur les souches circulant chez les chiens et chez les hôtes réservoirs pourrait permettre de mieux identifier le risque d'exposition chez l'Homme.

### *Comportements à risque*

Le rapprochement physique de l'Homme vers le rat, par ex. la détention de rats domestiqués aussi appelés NAC, « Nouveaux Animaux de Compagnie » ou l'utilisation des rats en expérimentation, pose également un problème de santé publique. Ce risque est concrètement identifié en France par 20 cas de cowpox viroses apparus chez de jeunes adultes propriétaires de rat domestiqués (Ninove *et al.*, 2009). Bien que ce virus n'ait pas été identifié chez les rats du Rhône, les exemples de transmission de ZAR par les rats domestiqués sont récurrents dans la littérature. Dans les faits d'actualité (20 mars 2015), un cas fatal de typhus murin<sup>9</sup> a été rapporté aux États-Unis, suite à une morsure par un rat détenu dans un contexte domestique. Récemment, au Royaume-Uni, la transmission du virus Séoul a été décrit chez de jeunes adultes propriétaires de rats domestiqués (Jameson *et al.*, 2013b). La transmission de leptospirose dans ce contexte a également été décrite en Allemagne (Guerra *et al.*, 2008). Dans les animaleries commerciales (ouvertes au public), le risque de transmission zoonotique à partir de rats est également avéré (Jameson *et al.*, 2013b; Shvartsblat *et al.*, 2004) cependant, aucun contrôle n'est en place pour démontrer l'absence d'agents zoonotiques circulant dans les élevages d'origine ou dans les animaleries. Connaissant désormais le statut sanitaire des rats sauvages dans le Rhône, il est raisonnable d'identifier un risque de contamination des rats d'élevages par des individus sauvages et en conséquence, un risque d'apparition de foyers de ZAR chez des propriétaires de rats domestiqués pourra être observé si aucun contrôle n'est mis en place à l'avenir.

### *Changements environnementaux*

La tendance à l'émergence de ZAR dans le monde semble associée à ce que l'on a appelé les changements généraux bien que leur influence n'ait pas été quantifiée. Parmi ces phénomènes, l'urbanisation pose un problème de santé publique principalement par le rapprochement physique du rat vers l'Homme favorisant le contact direct ou indirect et la transmission d'agent zoonotique. Bien que l'augmentation des cas humains ZAR ne soit pas décrit sur notre site d'étude, la circulation accrue des ZAR parmi les rats urbains est suggérée et l'enregistrement de cas inattendus de leptospirose à

---

<sup>9</sup> <http://outbreaknewstoday.com/pennsylvania-infant-died-of-rat-bite-fever-coroner-80392/> consulté le 30/03/15

Marseille (Socolovschi *et al.* 2011) montre que le risque de transmission de ZAR dans le contexte urbain est présent en France et doit être considéré pour orienter la prévention.

Bien que l'effet du changement climatique sur l'augmentation de l'incidence des ZAR soit attendu en France (Dufour *et al.*, 2008), un tel effet est difficilement quantifiable compte tenu du nombre important de variables impliquées dans l'apparition de ZAR et du manque d'indicateurs précis pour caractériser cet effet. Cet effet pourrait avoir contribué à l'augmentation des cas de leptospirose observés chez les chiens et chez l'Homme ces dernières années cependant, il n'est pas mis en évidence par nos travaux. L'effet du changement climatique reste néanmoins avéré au niveau mondial et il doit être considéré par les autorités sanitaires pour appréhender le risque d'exposition aux ZAR dans les années à venir.

Face à aux changements écologiques et comportementaux et face à la situation sanitaire documentée dans le Rhône par nos travaux, il est avisé de mettre en place des dispositifs de surveillance opérationnels et des signaux d'alerte pour prévenir une possible augmentation des cas dans les décennies à venir. Dans le tableau 16, nous présentons de façon synthétique les outils et méthodes de surveillance que nous avons étudié au cours de nos travaux de thèse.

## **Prévention**

### *La prévention médicale*

Parmi les ZAR, la leptospirose peut faire l'objet d'une prévention vaccinale chez l'Homme et chez les animaux domestiques en France. La vaccination dirigée contre un séro groupe n'apportant pas de protection croisée contre les autres séro groupes (Levett *et al.*, 2001), les valences vaccinales incluses doivent cibler en priorité les séro groupes infectants prédominants. Chez l'Homme le vaccin disponible en France (Spirolept ®) est un vaccin inactivé incluant la valence *L. icterohaemorrhagiae*. L'INVS rapporte une diminution notable des cas de leptospirose professionnelle depuis la mise en place de la vaccination chez les professionnels à risque (*i.e.* égoutiers). Chez le chien, un vaccin inactivé bivalent incluant *L. icterohaemorrhagiae* et *L. canicola* a été largement utilisé et la couverture vaccinale de la leptospirose canine s'élargit depuis 2012 avec l'inclusion des valences *L. australis* et *L. grippotyphosa*. Enfin, chez les bovins, un vaccin inactivé incluant la valence *L. hardjo* est disponible depuis 2012. Après plusieurs décennies d'application du vaccin bivalent canin, l'enregistrement de cas cliniques associés à des séro groupes infectants jusque-là peu répertoriés (Renaud *et al.*, 2012; Stokes *et al.*, 2007) soulève la question de l'adéquation entre les valences vaccinales utilisées et la réalité clinique changeante. Dans ce contexte, il est important d'isoler et de caractériser les souches circulant chez les



hôtes réservoirs tel que nous l'avons fait chez les rats de Lyon (*Cf.* chapitre 5) afin d'anticiper les besoins de la prévention médicale à venir.

### *Prévention sanitaire*

Nos travaux n'ont pas permis d'établir un lien entre l'infection des rats et des cas humains et la transmission de ZAR du rat à l'Homme serait plus probablement associée à des situations à risque (*e.g.* grève des éboueurs) où le contact rat-Homme est accru. Une première mesure de prévention sanitaire est de maintenir la lutte soutenue pour limiter l'expansion de cette espèce nuisible. Nous avons souligné dans le chapitre 5, l'importance de caractériser la démographie des populations infectées lors de mesures de contrôle des populations à des fins sanitaires. Nos résultats et les données de la littérature suggèrent un portage accru de ZAR dans les populations de rats adultes (*vs* juvéniles) et les mesures de contrôle devraient cibler en priorité ces populations (Himsworth *et al.*, 2014 ; Easterbrook *et al.* 2007). Les anti-vitamines K1 sont, depuis des décennies, largement utilisées pour limiter les populations de rats cependant, leurs effets sont limités dans le temps, impliquant leur renouvellement régulier et un coût considérable. En outre, des phénomènes de résistance observés et croissants chez les rats conduisent à une perte d'efficacité de ces molécules (Meerburg *et al.*, 2014) qui ont également un impact écologique néfaste. Une lutte intégrative pour le contrôle des populations de rat est maintenant préconisée (*e.g.* gestion des déchets, réparation et adaptation des infrastructures)<sup>10</sup> en complément ou en remplacement de la lutte chimique. Quelles que soient les méthodes mise en place jusqu'à ce jour, elles n'ont apporté qu'une réponse partielle à l'éradication des populations de rats, la forte capacité d'adaptation de cette espèce a permis leur maintien dans l'habitat de l'Homme. Si la lutte contre l'expansion des populations murines doit être maintenue, elle ne permettra pas à court ou moyen terme leur éradication ni leur assainissement. D'autres mesures doivent donc être développées en complément de ces premières.

Devant la difficulté de limiter la dispersion des hôtes réservoirs, la prévention de la transmission des ZAR par la modification de comportements humains à risque serait une mesure prometteuse pour limiter le passage des agents du rat à l'Homme. La communication du risque serait donc une clé dans la prévention sanitaire des ZAR. Les campagnes d'information des populations à risque et du personnel de santé sont d'autant plus accessibles que les réseaux de communication se développent actuellement. La stratégie de communication est le principal enjeu de son succès comme l'ont montré de précédentes campagnes sanitaires. La perception des rats par la population varie selon les points de

---

<sup>10</sup> <http://www.cdc.gov/nceh/ehs/elearn/ipm.htm> consulté le 11/05/15

vue (*e.g.* intérêt pour le maintien de cette espèce en tant que nouvel animal de compagnie, tolérance variable de la présence de rat autour des habitations). Le message portant le risque sanitaire associé aux rats doit donc prendre ces aspects sociologiques pour solliciter l'intérêt des uns et des autres.

## PERSPECTIVES

La problématique des ZAR multi-hôtes (*e.g.* difficultés d'identifier la source des cas humains ou animaux, de compréhension de l'épidémiologie et d'établir des mesures de prévention) a été citée à plusieurs reprises dans ce manuscrit, elle doit faire l'objet d'une attention particulière car l'étude du risque d'exposition à ces ZAR ne peut se faire sans la prise en considération des interactions entre les hôtes réservoirs. Si en milieu urbain, l'interaction du rat et des autres mammifères sauvages est plus limitée, son importance est substantielle en milieu rural.

Dans le cas de la leptospirose, tous les mammifères peuvent être infectés et de nombreuses espèces, en particulier de la faune sauvage, sont décrites comme des réservoirs en France, à l'instar du ragondin (*Myocastor coypus*) et du rat musqué (*Ondrata zibethicus*) (Richomme *et al.*, 2012; Trap, 1988) du fait de leur portage rénal. Les études récentes sur le portage de *Leptospira* dans la faune sauvage sont fondée sur le MAT pour déterminer les sérovars impliqués à défaut de méthodes plus performantes (Espí *et al.*, 2010; Javier Millán, 2008). Appliqué à de larges échantillonnages, le MAT fournit des résultats intéressants pour déterminer et comparer les profils d'exposition d'espèces d'une même région (*cf.* Annexe 24); cependant la détermination des sérovars par le MAT manque de précision (Smythe *et al.*, 2009) et ne permet pas d'étudier la source de l'infection. L'investigation épidémiologique de ces réservoirs potentiels et notamment la détermination précise du sérotype ou génotype associé est essentielle pour la compréhension de l'épidémiologie de la leptospirose. La détection bactérienne par des méthodes telles que la VNTR et la MST pourrait apporter une résolution suffisante pour déterminer les génogroupes circulants et éventuellement discriminer les souches d'une espèce à l'autre et d'une zone géographique à une autre, permettant d'envisager la reconnaissance de la source d'une infection. En outre, l'investigation d'un habitat doit être étendue à un large spectre de mammifères afin de prendre en compte les interactions intra et inter spécifiques formant dans leur ensemble, le réservoir sauvage. Une étude exploratoire multi espèces à l'aide de méthodes moléculaires performantes permettrait de caractériser ce réservoir sauvage en établissant la répartition des souches dans l'espace, dans le temps et par espèce.

Une telle étude est actuellement en cours et menée par l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses (ELIZ). Elle a pour but de déterminer le portage rénal chez plus de 20 espèces de mammifères sauvages dans plus de 30 départements en France métropolitaine, de déterminer les génogroupes ou génovars circulant chez ces mammifères et l'existence d'éventuels nouveaux réservoirs. *In fine*, une cartographie des souches présentes pourra compléter nos travaux chez le rat et améliorer la prévention de la maladie chez l'Homme et les animaux domestiques en permettant d'établir un éventuel lien épidémiologique entre l'agent de la leptospirose humaine et d'une espèce source. Cette étude sans précédent dans le domaine de la leptospirose ouvre concrètement les perspectives de la recherche sur les zoonoses associées aux rats.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les ZAR sont des maladies non spécifiques, sous-diagnostiquées et parfois fatales chez l'Homme. Le nombre des cas est étroitement lié aux comportements de l'Homme et aux facteurs écologiques, fondamentalement modifiés ces dernières décennies. Face à cette situation, la surveillance des maladies chez l'Homme ne fournit qu'un reflet erroné de la réalité et une surveillance chez l'animal permettra une meilleure maîtrise de ces maladies.

Les ZAR rapportée chez l'Homme en France (*Leptospira*, hantavirus, virus cowpox, *T. gondii*) correspondent, à l'exception du virus cowpox qui n'a pas été détecté, aux agents que nous avons mis en évidence chez les rats du Rhône. La cohérence de ces observations justifie la surveillance des ZAR pour orienter les actions de santé publique lors d'émergence ou d'augmentation de la prévalence associée à un risque accru de transmission à l'Homme. Avec plus de vingt agents zoonotiques devant être considérés, la micro-puce à ADN développée dans le cadre du projet WildTech et finalisée sera un atout considérable pour assurer la surveillance sanitaire murine, y compris sur une base événementielle.

Au regard de nos travaux, la surveillance des ZAR, à la source ou au niveau d'espèces cibles, relais ou sentinelles de la contamination humaine est donc possible. Idéalement, cette surveillance devrait relever d'un suivi en continu de la présence d'agents zoonotiques ou de ses indicateurs. Dans la réalité, le résultat de dépistage sur des échantillons obtenus par divers modes de collecte se confronte au risque d'une faible représentativité. Cependant, comme la plupart des réseaux d'épidémiosurveillance animale, l'objectif de la surveillance des ZAR est d'être capable de détecter une présence du danger et de suivre des tendances dans le temps. Face aux contraintes de l'échantillonnage dans la faune sauvage et du rat en particulier, il est essentiel de développer une surveillance basée sur le risque de présence.

Les déterminants qui régissent la distribution du statut infectieux chez les hôtes de ZAR sont peu documentés et leur connaissance pourrait substantiellement améliorer la sensibilité de la surveillance en indiquant les zones plus à risque de présence. Des études écologiques de la persistance et de la propagation des ZAR dans les populations animales hôtes, en particulier les rats, permettraient de mieux cerner les facteurs de risque associés à l'habitat, et donc de mieux envisager des mesures de prévention.

Les expériences du passé, anciennes ou récentes montrent qu'il n'est pas possible de prévoir où et quand va émerger une maladie; néanmoins, cette expérience est nécessaire pour nous y préparer. Se préparer à agir pour la santé publique repose sur les connaissances épidémiologiques alors que le déclenchement de l'action dépend d'indicateurs issus de la surveillance. En proposant une réflexion sur l'épidémiologie et la surveillance des maladies associées aux rats, nos travaux traitent du risque sanitaire lié à cette espèce, connu depuis des siècles mais peu quantifié, et se placent dans le cadre des actions pour la santé publique.

**Tableau 16 – Synthèse sur les outils et méthodes de surveillance**

Outil/Méthode	Agent (s)	espèce	Population source	Type échantillonnage	Individus échantillonnés	fréquence échantillonnage	Taille échantillonnage	Indicateur	information fournies	Avantage	Inconvénient
Sérologie	<i>Leptospira</i> spp. <i>T. gondii</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	pop générale	Empirique, éviter agrégation	individus morts collectés / société de dératISATION et/ou captures ciblées	En continu sur 1 année	≥ 90	Résultat positif	Exposition	Rapide, €	Manque de sensibilité
PCR	<i>Leptospira</i> pathogènes, SEOV, VHE	<i>Rattus norvegicus</i>	pop générale	Empirique, éviter agrégation	individus morts collectés / société de dératISATION et/ou captures ciblées	Annuelle Sur <1 mois	intensif	proportion positifs/négatifs	≈Prévalence	Détection directe	Logistique si PCR multiple €€
micro-puce ADN «rongeurs commensaux» WildTech	Multi-pathogènes	<i>Rattus spp</i>	pop générale	Empirique, éviter agrégation		En continu Sur 1 année	≥ 90	Résultat positif	Présence	Détection directe-multiple €	manque de sens. / spé
Multispacer Sequence Typing	<i>L. interrogans</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	colonies	aléatoire à 2 degrés	captures ciblées, ind vivants de préférence	Annuelle ou semestrielle Sur <1 mois	≥ 5 PCR+/colonies	profil MST	distribution spatio-temporelle des souches	identification de la souche	Limité à <i>L. interrogans</i> €€€
MAT/ classification des cas incluant vs excluant IH et/ou CAN	<i>Leptospira</i> spp.	Chiens	population des leptospiroses CN cliniques	type grappe, LdL	population avec SC évocateurs et testée au LdL	Annuelle	ensemble des données du Laboratoire	valeur d'incidence/département	Estimation de l'incidence	données disponibles	Biais
MAT/ détermination du sérotype infectant selon la valeur des titres	<i>Leptospira</i> spp.	Chiens / Bovins	population des leptospiroses CN cliniques	type grappe, LdL	population avec SC évocateurs et testée au LdL	Annuelle	ensemble des données du Laboratoire	distribution des sérogroupes	prédominance des sérogroupes impliqués dans les infections cliniques	données disponibles	Biais
MAT/ Ratio d'Incidence Standardisé (SIR <sub>s</sub> ) lissé selon des variables environnementales et populationnelles	<i>Leptospira</i> spp.	Chiens / Bovins / Porcins	population des leptospiroses CN cliniques	type grappe, LdL	population avec SC évocateurs et testée au LdL	> bisannuel	ensemble des données du Laboratoire	SIRs/département	Distribution spatiale du SIRs	données disponibles	Biais

LdL : Laboratoire des Leptospires – Lyon

Cout par échantillon et par pathogène : €≈15€, €€≈30, €€€≈60€

## RÉFÉRENCES

- Adler, B., and de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296.
- Agudelo-Flórez, P., Londoño, A.F., Quiroz, V.H., Angel, J.C., Moreno, N., Loaiza, E.T., Muñoz, L.F., and Rodas, J.D. (2009). Prevalence of *Leptospira* spp. in urban rodents from a groceries trade center of Medellin, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 906–910.
- Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition--A review. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6, 297–305.
- André-Fontaine, G., Nicholas, D., Scalzo, B., Keta, A., and Nanjiani, I.A. (2010). Prévalence sérologique de la leptospirose à *Leptospira* sérovar hardjo chez les bovins femelles adultes en France en 2004. *Bulletin des G.T.V.* 67–74.
- Athanazio, D.A., Silva, E.F., Santos, C.S., Rocha, G.M., Vannier-Santos, M.A., McBride, A.J.A., Ko, A.I., and Reis, M.G. (2008). *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop.* 105, 176–180.
- Aviat, F., Blanchard, B., Michel, V., Blanchet, B., Branger, C., Hars, J., Mansotte, F., Brasme, L., De Champs, C., Bolut, P., *et al.* (2009). *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 463–476.
- Ayral, F. (2013). Hantavirose à virus Séoul : émergence d’une zoonose chez les rats en Europe. *Le Point Vétérinaire* 14–18.
- Ayral, F., Artois, J., Zilber, A.-L., Widén, F., Pounder, K.C., Aubert, D., Bicout, D.J., and Artois, M. (2014). The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010-2012). *Epidemiol. Infect.* 1–14.
- Azad, A.F., Radulovic, S., Higgins, J.A., Noden, B.H., and Troyer, J.M. (1997). Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 319–327.
- Backhans, A., Fellström, C., and Lambertz, S.T. (2011). Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in small wild rodents. *Epidemiol. Infect.* 139, 1230–1238.
- Balleydier, E., Camuset, G., Socolovschi, C., Moiton, M.-P., Kuli, B., Foucher, A., Poubeau, P., Borgherini, G., Wartel, G., Audin, H., *et al.* (2015). Murine Typhus, Reunion, France, 2011–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 316–319.
- Baranton, G., and POSTIC, D. (2005). La leptospirose en France de 2001 à 2003. *Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001-2003.*
- Baranton, G., and Postic, D. (2006). Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 10, 162–170.
- Barcellos, C., and Sabroza, P.C. (2001). The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cad. Saúde Pública* 17 Suppl, 59–67.
- Barmettler, R., Schweighauser, A., Bigler, S., Grooters, A.M., and Francey, T. (2011). Assessment of exposure to *Leptospira* serovars in veterinary staff and dog owners in contact with infected dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 238, 183–188.
- Begon, M. (2003). Disease: health effects on humans, population effects on rodents in Rat, mice and people: rodent biology and management. 13–19.

- Bengis, R.G., Leighton, F.A., Fischer, J.R., Artois, M., Mörner, T., and Tate, C.M. (2004). The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 23, 497–511.
- Bhardwaj, P., Kosambiya, J.K., and Desai, V.K. (2008). A case control study to explore the risk factors for acquisition of leptospirosis in Surat city, after flood. *Indian J. Med. Sci.* 62, 431–438.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., *et al.* (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3, 757–771.
- Bihl, F., and Negro, F. (2010). Hepatitis E virus: a zoonosis adapting to humans. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 817–821.
- Billeter, S.A., Gundi, V.A.K.B., Rood, M.P., and Kosoy, M.Y. (2011). Molecular detection and identification of *Bartonella* species in *Xenopsylla cheopis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae) collected from *Rattus norvegicus* rats in Los Angeles, California. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7850–7852.
- Boisier, P., Rasolomaharo, M., Ranaivoson, G., Rasoamanana, B., Rakoto, L., Andrianirina, Z., Andriamahefazafy, B., and Chanteau, S. (1997). Urban epidemic of bubonic plague in Majunga, Madagascar: epidemiological aspects. *Trop. Med. Int. Health* 2, 422–427.
- Boisier, P., Rahalison, L., Rasolomaharo, M., Ratsitorahina, M., Mahafaly, M., Razafimahefa, M., Duplantier, J.-M., Ratsifasoamanana, L., and Chanteau, S. (2002). Epidemiologic Features of Four Successive Annual Outbreaks of Bubonic Plague in Mahajanga, Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 311–316.
- Bolzoni, L., Real, L., and De Leo, G. (2007). Transmission heterogeneity and control strategies for infectious disease emergence. *PloS One* 2, e747.
- Boulouis, H.-J., Chang, C.-C., Henn, J.B., Kasten, R.W., and Chomel, B.B. (2005). Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet. Res.* 36, 383–410.
- Bourhy, P., Bremont, S., Zinini, F., Giry, C., and Picardeau, M. (2011). Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2154–2160.
- Breitschwerdt, E.B., and Kordick, D.L. (2000). *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 428–438.
- Broom, J.C., Coghlan, J.D., and Kmety, E. (1960). *Leptospira bratislava* isolated from a Hedgehog in Scotland. *Lancet* 1326–1327.
- Butler, F.T., and Whelan, J. (1994). Population structure and reproduction in brown rats (*Rattus norvegicus*) from pig farms, Co. Kildare, Ireland. *J. Zool.* 233, 277–291.
- Cannon, G.A., Carr, M.J., Yandle, Z., Schaffer, K., Kidney, R., Hosny, G., Doyle, A., Ryan, J., Gunson, R., Collins, T., *et al.* (2010). A low density oligonucleotide microarray for the detection of viral and atypical bacterial respiratory pathogens. *J. Virol. Methods* 163, 17–24.
- Cavanaugh, D.C. (1971). Specific effect of temperature upon transmission of the plague bacillus by the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 264–273.
- Cerqueira, G.M., and Picardeau, M. (2009). A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 9, 760–768.
- Chanteau, S., Ratsifasoamanana, L., Rasoamanana, B., Rahalison, L., Randriambeloso, J., Roux, J., and Rabeson, D. (1998). Plague, a reemerging disease in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 101–104.

- Chanteau, S., Ratsitorahina, M., Rahalison, L., Rasoamanana, B., Chan, F., Boisier, P., Rabeson, D., and Roux, J. (2000). Current epidemiology of human plague in Madagascar. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 2, 25–31.
- Chantrey, J., Meyer, H., Baxby, D., Begon, M., Bown, K.J., Hazel, S.M., Jones, T., Montgomery, W.I., and Bennett, M. (1999). Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol. Infect.* 122, 455–460.
- Chappel, R.J., Goris, M., Palmer, M.F., and Hartskeerl, R.A. (2004). Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5484–5488.
- Chen, H.D., and Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 83–98.
- Childs, J.E., Schwartz, B.S., Ksiazek, T.G., Graham, R.R., LeDuc, J.W., and Glass, G.E. (1992). Risk factors associated with antibodies to leptospires in inner-city residents of Baltimore: a protective role for cats. *Am. J. Public Health* 82, 597–599.
- Cimolai, N. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada: a historical perspective and lessons learned. *Can. J. Microbiol.* 56, 89–120.
- Civen, R., and Ngo, V. (2008). Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 46, 913–918.
- Clapperton, B. (2006). A review of the current knowledge of rodent behaviour in relation to control devices (New Zealand: Science & Technical Publishing).
- Clarke, K.-A.R., Fitzgerald, S.D., Zwick, L.S., Church, S.V., Kaneene, J.B., Wismer, A.R., Bolin, C.A., Hattey, J.A., and Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2007). Experimental inoculation of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*), house mice (*Mus musculus*), and Norway rats (*Rattus norvegicus*) with *Mycobacterium bovis*. *J. Wildl. Dis.* 43, 353–365.
- Clements, A.C.A., Magalhães, R.J.S., Tatem, A.J., Paterson, D.L., and Riley, T.V. (2010). *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect. Dis.* 10, 395–404.
- Coburn, B., Grassl, G.A., and Finlay, B.B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* 85, 112–118.
- Comer, J.A., Paddock, C.D., and Childs, J.E. (2001). Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 1, 91–118.
- Cooper, K., Huang, F.F., Batista, L., Rayo, C.D., Bezanilla, J.C., Toth, T.E., and Meng, X.J. (2005). Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1684–1688.
- Cosson, J.-F., Picardeau, M., Mielcarek, M., Tatard, C., Chaval, Y., Suputtamongkol, Y., Buchy, P., Jittapalpong, S., Herbreteau, V., and Morand, S. (2014). Epidemiology of leptospirosis transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2902.
- Costa F, Porter FH, Rodrigues G, Farias H, de Faria MT, Wunder EA, Osikowicz LM, Kosoy MY, Reis MG, Ko AI, Childs JE. (2014) Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul virus, and *Bartonella* spp. among Norway rats (*Rattus norvegicus*) from the urban slum environment in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14(1):33-40.



- Crowcroft, N.S., Infuso, A., Ilef, D., Le Guenno, B., Desenclos, J.-C., Van Loock, F., and Clement, J. (1999). Risk factors for human hantavirus infection: Franco-Belgian collaborative case-control study during 1995-6 epidemic. *BMJ* 318, 1737–1738.
- Cueto, G.R., Cavia, R., Bellomo, C., Padula, P.J., and Suárez, O.V. (2008). Prevalence of hantavirus infection in wild *Rattus norvegicus* and *R. rattus* populations of Buenos Aires City, Argentina. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 13, 46–51.
- Davis, S., Calvet, E., and Leirs, H. (2005). Fluctuating rodent populations and risk to humans from rodent-borne zoonoses. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 5, 305–314.
- Delahay, R.J., De Leeuw, A.N.S., Barlow, A.M., Clifton-hadley, R.S., and Cheeseman, C.L. (2002). The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals: a review. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 164, 90–105.
- Deming, W.C. (1894). The extermination of infectious disease. *New York Medical Journal* 710–715.
- Dohoo, I., Martin, W., and Stryhn, H. (2003). *Veterinary Epidemiologic Research, Screening and diagnostic tests* (Charlottetown, Prince Edward Island: AVC Inc.).
- Dremsek, P., Wenzel, J.J., Johne, R., Ziller, M., Hofmann, J., Groschup, M.H., Werdermann, S., Mohn, U., Dorn, S., Motz, M., *et al.* (2012). Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 201, 189–200.
- Dreyfus, A., Benschop, J., Collins-Emerson, J., Wilson, P., Baker, M.G., and Heuer, C. (2014). Sero-prevalence and risk factors for leptospirosis in abattoir workers in New Zealand. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 11, 1756–1775.
- Dubey, J.P. (2010). *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health* 57, 60–73.
- Dubey, J.P., and Desmonts, G. (1987). Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Vet. J.* 19, 337–339.
- Dubey, J.P., Bhaiyat, M.I., Macpherson, C.N.L., de Allie, C., Chikweto, A., Kwok, O.C.H., and Sharma, R.N. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. *J. Parasitol.* 92, 1107–1108.
- Ducournau, C., Ferrier-Rembert, A., Ferraris, O., Joffre, A., Favier, A.-L., Flusin, O., Van Cauteren, D., Kecir, K., Auburtin, B., Védy, S., *et al.* (2013). Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1996–1999.
- Dufour, B., Moutou, F., Hattenberger, A.M., and Rodhain, F. (2008). Global change: impact, management, risk approach and health measures--the case of Europe. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 27, 529–550.
- Van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C., Pyörälä, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J., *et al.* (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2705–2714.
- Dupinay, T., Pounder, K.C., Ayral, F., Laaberki, M.-H., Marston, D.A., Lacôte, S., Rey, C., Barbet, F., Voller, K., Nazaret, N., *et al.* (2014). Detection and genetic characterization of Seoul virus from commensal brown rats in France. *Virol. J.* 11, 32.
- Dupouey, J., Faucher, B., Edouard, S., Richet, H., de Broucker, C.-A., Marié, J.-L., Kodjo, A., and Davoust, B. (2014). Epidemiological investigation of a human leptospirosis case reported in a suburban area near Marseille. *New Microbes New Infect.* 2, 82–83.
- Easterbrook, J.D., Shields, T., Klein, S.L., and Glass, G.E. (2005). Norway rat population in Baltimore, Maryland, 2004. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 5, 296–299.

- Easterbrook, J.D., Kaplan, J.B., Vanasco, N.B., Reeves, W.K., Purcell, R.H., Kosoy, M.Y., Glass, G.E., Watson, J., And Klein, S.L. (2007). A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiol. Infect.* 135, 1192–1199.
- Easterbrook, J.D., Zink, M.C., and Klein, S.L. (2007). Regulatory T cells enhance persistence of the zoonotic pathogen Seoul virus in its reservoir host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15502–15507.
- Egenvall, A., Bonnett, B., Hedhammar, Å., and Olson, P. (2005). Mortality in over 350,000 Insured Swedish Dogs from 1995–2000: II. Breed-Specific Age and Survival Patterns and Relative Risk for Causes of Death. *Acta Vet. Scand.* 46, 121–136.
- Elliott, S.P. (2007). Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 13–22.
- Ellis, W.A., O'Brien, J.J., and Cassells, J. (1981). Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland. *Vet. Rec.* 108, 555–557.
- Emlen, J., Stokes, A., and Winsor, C. (1948). The rate of recovery of decimated populations of brown rats in nature. 29, 133–146.
- Espí, A., Prieto, J.M., and Alzaga, V. (2010). Leptospiral antibodies in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), fallow deer (*Dama dama*) and European wild boar (*Sus scrofa*) in Asturias, Northern Spain. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 183, 226–227.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2015 (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13, 162.
- Evangelista, K.V., and Coburn, J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5, 1413–1425.
- Fang, F., Collins-Emerson, J.M., Cullum, A., Heuer, C., Wilson, P.R., and Benschop, J. (2014). Shedding and Seroprevalence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Sheep and Cattle at a New Zealand Abattoir. *Zoonoses Public Health*.
- De Faria, M.T., Calderwood, M.S., Athanazio, D.A., McBride, A.J.A., Hartskeerl, R.A., Pereira, M.M., Ko, A.I., and Reis, M.G. (2008). Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.* 108, 1–5.
- Favorov, M.O., Kosoy, M.Y., Tsarev, S.A., Childs, J.E., and Margolis, H.S. (2000). Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J. Infect. Dis.* 181, 449–455.
- Firth, C., Bhat, M., Firth, M.A., Williams, S.H., Frye, M.J., Simmonds, P., Conte, J.M., Ng, J., Garcia, J., Bhuva, N.P., *et al.* (2014). Detection of Zoonotic Pathogens and Characterization of Novel Viruses Carried by Commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio* 5, e01933–14.
- Fraune, C.K., Schweighauser, A., and Francey, T. (2013). Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242, 1373–1380.
- Gaastra, W., Boot, R., Ho, H.T.K., and Lipman, L.J.A. (2009). Rat bite fever. *Vet. Microbiol.* 133, 211–228.
- Gay, N., Soupé-Gilbert, M.-E., and Goarant, C. (2014). Though not reservoirs, dogs might transmit *Leptospira* in New Caledonia. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 11, 4316–4325.
- Gikas, A., Doukakis, S., Pediaditis, J., Kastanakis, S., Psaroulaki, A., and Tselentis, Y. (2002). Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical, and therapeutic data from 83 cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 250–253.
- Githeko, A.K., Lindsay, S.W., Confalonieri, U.E., and Patz, J.A. (2000). Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull. World Health Organ.* 78, 1136–1147.

- Glass, G.E., Korch, G.W., and Childs, J.E. (1988). Seasonal and Habitat Differences in Growth Rates of Wild *Rattus norvegicus*. *J. Mammal.* 69, 587.
- Gotteland, C., Chaval, Y., Villena, I., Galan, M., Geers, R., Aubert, D., Pouille, M.-L., Charbonnel, N., and Gilot-Fromont, E. (2014). Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology* 141, 259–268.
- Gray, E., Atatoa-Carr, P., Bell, A., Roberts, S., Al Mudallal, D., and Mills, G.D. (2007). Murine typhus: a newly recognised problem in the Waikato region of New Zealand. *N. Z. Med. J.* 120, U2661.
- Guan, P., Huang, D., He, M., Shen, T., Guo, J., and Zhou, B. (2009). Investigating the effects of climatic variables and reservoir on the incidence of hemorrhagic fever with renal syndrome in Huludao City, China: a 17-year data analysis based on structure equation model. *BMC Infect. Dis.* 9, 109.
- Gubler, D.J., Reiter, P., Ebi, K.L., Yap, W., Nasci, R., and Patz, J.A. (2001). Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environ. Health Perspect.* 109 Suppl 2, 223–233.
- Guerra, M.A. (2009). Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 472–478, 430.
- Guerra, B., Schneider, T., Luge, E., Draeger, A., Moos, V., Loddenkemper, C., Jansen, A., and Nöckler, K. (2008). Detection and characterization of *Leptospira interrogans* isolates from pet rats belonging to a human immunodeficiency virus-positive patient with leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* 57, 133–135.
- Hancke, D., Navone, G.T., and Suarez, O.V. (2011). Endoparasite community of *Rattus norvegicus* captured in a shantytown of Buenos Aires City, Argentina. *Helminthologia* 48, 167–173.
- Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., and Laurenson, M.K. (2002). Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1468–1473.
- Heyman, P., Plyusnina, A., Berny, P., Cochez, C., Artois, M., Zizi, M., Pirnay, J.P., and Plyusnin, A. (2004). Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 23, 711–717.
- Heyman, P., Baert, K., Plyusnina, A., Cochez, C., Lundkvist, A., Esbroeck, M.V., Goossens, E., Vandenvelde, C., Plyusnin, A., and Stuyck, J. (2009). Serological and genetic evidence for the presence of Seoul hantavirus in *Rattus norvegicus* in Flanders, Belgium. *Scand. J. Infect. Dis.* 41, 51–56.
- Hickman, D.L., and Swan, M. (2010). Use of a Body Condition Score Technique to Assess Health Status in a Rat Model of Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. JAALAS* 49, 155–159.
- Himsworth, C.G., Parsons, K.L., Jardine, C., and Patrick, D.M. (2013a). Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 13, 349–359.
- Himsworth, C.G., Patrick, D.M., Parsons, K., Feng, A., and Weese, J.S. (2013b). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in rats. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 169–170.
- Himsworth, C.G., Bidulka, J., Parsons, K.L., Feng, A.Y.T., Tang, P., Jardine, C.M., Kerr, T., Mak, S., Robinson, J., and Patrick, D.M. (2013c). Ecology of *Leptospira interrogans* in Norway Rats (*Rattus norvegicus*) in an Inner-City Neighborhood of Vancouver, Canada. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2270.
- Himsworth, C.G., Miller, R.R., Montoya, V., Hoang, L., Romney, M.G., Al-Rawahi, G.N., Kerr, T., Jardine, C.M., Patrick, D.M., Tang, P., *et al.* (2014a). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). *PloS One* 9, e87983.

- Himsworth, C.G., Patrick, D.M., Mak, S., Jardine, C.M., Tang, P., and Weese, J.S. (2014b). Carriage of *Clostridium difficile* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*) and black rats (*Rattus rattus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1299–1305.
- Himsworth, C.G., Jardine, C.M., Parsons, K.L., Feng, A.Y.T., and Patrick, D.M. (2014c). The characteristics of wild rat (*Rattus* spp.) populations from an inner-city neighborhood with a focus on factors critical to the understanding of rat-associated zoonoses. *PloS One* 9, e91654.
- Hinnebusch, B.J., Fischer, E.R., and Schwan, T.G. (1998). Evaluation of the Role of the *Yersinia pestis* Plasminogen Activator and Other Plasmid-Encoded Factors in Temperature-Dependent Blockage of the Flea. *J. Infect. Dis.* 178, 1406–1415.
- Hinson, E.R., Shone, S.M., Zink, M.C., Glass, G.E., and Klein, S.L. (2004). Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 310–317.
- Hoeden, J. van den (1958). Leptospiral Infections in Hedgehogs. *J. Infect. Dis.* 103, 225–238.
- Holt, J., Davis, S., and Leirs, H. (2006). A model of Leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: seasonal fluctuations and the impact of rodent control. *Acta Trop.* 99, 218–225.
- Jameson, L.J., Taori, S.K., Atkinson, B., Levick, P., Featherstone, C.A., van der Burgt, G., Mc Carthy, N., Hart, J., Osborne, J.C., Walsh, A.L., *et al.* (2013a). Pet rats as a source of hantavirus in England and Wales, 2013. *Euro Surveill.* 18.
- Jameson, L.J., Logue, C.H., Atkinson, B., Baker, N., Galbraith, S.E., Carroll, M.W., Brooks, T., and Hewson, R. (2013b). The continued emergence of hantaviruses: isolation of a Seoul virus implicated in human disease, United Kingdom, October 2012. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 18, 4–7.
- Jansen, A., Schöneberg, I., Frank, C., Alpers, K., Schneider, T., and Stark, K. (2005). Leptospirosis in Germany, 1962–2003. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1048–1054.
- Javier Millán, M.G.C. (2008). Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 9, 549–554.
- Jiang, J.-F., Zuo, S.-Q., Zhang, W.-Y., Wu, X.-M., Tang, F., De Vlas, S.J., Zhao, W.-J., Zhang, P.-H., Dun, Z., Wang, R.-M., *et al.* (2008). Prevalence and genetic diversities of hantaviruses in rodents in Beijing, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 98–105.
- Jirintai, S., Tanggis, null, Mulyanto, null, Suparyatmo, J.B., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nagashima, S., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (2014). Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.* 185, 92–102.
- Johne, R., Heckel, G., Plenge-Bönig, A., Kindler, E., Maresch, C., Reetz, J., Schielke, A., and Ulrich, R.G. (2010). Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1452–1455.
- Johnson, M.A.S., Smith, H., Joseph, P., Gilman, R.H., Bautista, C.T., Campos, K.J., Cespedes, M., Klatsky, P., Vidal, C., Terry, H., *et al.* (2004). Environmental Exposure and Leptospirosis, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1016–1022.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., and Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993.
- Kaluza, P., Kölzsch, A., Gastner, M.T., and Blasius, B. (2010). The complex network of global cargo ship movements. *J. R. Soc. Interface* rsif20090495.
- Karesh, W.B., and Cook, R.A. (2005). The Human-Animal Link. *Foreign Aff.*

- Kariwa, H., Yoshimatsu, K., and Arikawa, J. (2007). Hantavirus infection in East Asia. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 341–356.
- Kataranovski, M., Mirkov, I., Belij, S., Popov, A., Petrović, Z., Gačić, Z., and Kataranovski, D. (2011). Intestinal helminths infection of rats ( *Ratus norvegicus* ) in the Belgrade area (Serbia): the effect of sex, age and habitat. *Parasite* 18, 189–196.
- Kawamata, J., Yamanouchi, T., Dohmae, K., Miyamoto, H., Takahashi, M., Yamanishi, K., Kurata, T., and Lee, H.W. (1987). Control of laboratory acquired hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Japan. *Lab. Anim. Sci.* 37, 431–436.
- Keeling, M.J., and Gilligan, C.A. (2000). Bubonic plague: a metapopulation model of a zoonosis. *Proc. Biol. Sci.* 267, 2219–2230.
- Kimura, A., Edagawa, A., Okada, K., Takimoto, A., Yonesho, S., and Karanis, P. (2007). Detection and genotyping of *Cryptosporidium* from brown rats (*Rattus norvegicus*) captured in an urban area of Japan. *Parasitol. Res.* 100, 1417–1420.
- Klaasen, H.L.B.M., Molkenboer, M.J.C.H., Vrijenhoek, M.P., and Kaashoek, M.J. (2003). Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet. Microbiol.* 95, 121–132.
- Ko, A.I., Galvão Reis, M., Ribeiro Dourado, C.M., Johnson, W.D., and Riley, L.W. (1999). Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354, 820–825.
- Ko, A.I., Goarant, C., and Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 736–747.
- Koizumi, N., Muto, M., Tanikawa, T., Mizutani, H., Sohmura, Y., Hayashi, E., Akao, N., Hoshino, M., Kawabata, H., and Watanabe, H. (2009). Human Leptospirosis Cases and the Prevalence of Rats Harboring *Leptospira interrogans* in Urban Areas of Tokyo, Japan. *J. Med. Microbiol.* 58, 1227–1230.
- Krøjgaard, L.H., Villumsen, S., Markussen, M.D.K., Jensen, J.S., Leirs, H., and Heiberg, A.-C. (2009). High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol. Infect.* 137, 1586–1592.
- Kurth, A., Wibbelt, G., Gerber, H.-P., Petschaelis, A., Pauli, G., and Nitsche, A. (2008). Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 670–671.
- Laarhoven, L.M., de Heus, P., van Luijn, J., Duim, B., Wagenaar, J.A., and van Duinkerken, E. (2011). Longitudinal study on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in households. *PloS One* 6, e27788.
- Lack, J.B., Volk, K., and Van Den Bussche, R.A. (2012). Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1268–1273.
- Lafferty, K.D. (2009). The ecology of climate change and infectious diseases. *Ecology* 90, 888–900.
- Laukkanen, R., Martínez, P.O., Siekkinen, K.-M., Ranta, J., Maijala, R., and Korkeala, H. (2008). Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the Pork Production Chain from Farm to Slaughterhouse. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5444–5450.
- Lee, H.W., and Johnson, K.M. (1982). Laboratory-acquired infections with Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 146, 645–651.
- Lee, H. s., Guptill, L., Johnson, A. j., and Moore, G. e. (2014). Signalment Changes in Canine Leptospirosis between 1970 and 2009. *J. Vet. Intern. Med.* 28, 294–299.
- Leirs, H., Verhagen, R., and Verheyen, W. (1994). the basis of reproductive seasonality *mastomys* rats. 10, 55–66.

- Leirs, H., Stenseth, N.C., Nichols, J.D., Hines, J.E., Verhagen, R., and Verheyen, W. (1997). Stochastic seasonality and nonlinear density-dependent factors regulate population size in an African rodent. *Nature* 389, 176–180.
- Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., and Bishai, W.R. (2012). Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International* 45, 587–602.
- Levett, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296–326.
- Levett, P.N. (2003). Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.* 36, 447–452.
- Li, T.-C., Ami, Y., Suzaki, Y., Yasuda, S.P., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takeda, N., and Takaji, W. (2013). Characterization of full genome of rat hepatitis E virus strain from Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 115–118.
- Liu, Q., Sun, J., Lu, L., Fu, G., Ding, G., Song, X., Meng, F., Wu, H., Yang, T., Ren, Z., *et al.* (2010). Detection of bartonella species in small mammals from Zhejiang Province, China. *J. Wildl. Dis.* 46, 179–185.
- Macé, G., Feyeux, C., Mollard, N., Chantegret, C., Audia, S., Rebibou, J.M., Spagnolo, G., Bour, J.B., Denoyel, G.A., Sagot, P., *et al.* (2013). Severe Seoul hantavirus infection in a pregnant woman, France, October 2012. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 18, 20464.
- Mailles, A., Vaillant, V., Haeghebaert, S., Fradet, M.R., Capek, I., and Zeller, H. (2005). Recrudescence des infections à Hantavirus, France 2003. *Médecine Mal. Infect.* 35, 68–72.
- Mailles, A., Madani, N., Maurin, M., Garin-Bastuji, B., and Vaillant, V. (2010). [Unexpected increase of human and animal tularemia cases during winter 2007/2008 in France: Emergence or short-lasting episode?]. *Médecine Mal. Infect.* 40, 279–284.
- Major, A., Schweighauser, A., and Francey, T. (2014). Increasing incidence of canine leptospirosis in Switzerland. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 11, 7242–7260.
- Massawe, A., Mulungu, L., Makundi, R., Dlamini, S., Eiseb, S., Kirsten, F., Mahlaba, T., Malebane, P., Maltitz, E., Monadjem, A., *et al.* (2011). Spatial and temporal population dynamics of rodents in three geographically different regions in Africa: Implication for ecologically-based rodent management. *African Zoology* 46, 393–405.
- Meerburg, B.G., Singleton, G.R., and Kijlstra, A. (2009). Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 221–270.
- Meng, X.-J. (2011). From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* 161, 23–30.
- Migliani, R., Chanteau, S., Rahalison, L., Ratsitorahina, M., Boutin, J.P., Ratsifasoamanana, L., and Roux, J. (2006). Epidemiological trends for human plague in Madagascar during the second half of the 20th century: a survey of 20,900 notified cases. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 11, 1228–1237.
- Milazzo, C., Ribas, A., Casanova, J., and Cagnin, M. (2010). Helminths of the brown rat (*Rattus norvegicus*) (Berkenhout, 1769) in the city of Palermo, Italy. *Helminthologia* 47, 238–240.
- Miller, M., Annis, K.M., Lappin, M., Gill, M., and Lunn, K. (2008). Sensitivity and specificity of the microscopic agglutination test for the diagnosis of leptospirosis in dogs. 22, 787.
- Mills, J.N. (2005). Regulation of rodent-borne viruses in the natural host: implications for human disease. *Arch. Virol. Suppl.* 45–57.

- Mills, J.N., Gage, K.L., and Khan, A.S. (2010). Potential influence of climate change on vector-borne and zoonotic diseases: a review and proposed research plan. *Environ. Health Perspect.* 118, 1507–1514.
- Monahan, A.M., Callanan, J.J., and Nally, J.E. (2009). Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet. Pathol.* 46, 792–799.
- Monecke, S., Monecke, H., and Monecke, J. (2009). Modelling the black death. A historical case study and implications for the epidemiology of bubonic plague. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 299, 582–593.
- Moore, G.E., Guptill, L.F., Glickman, N.W., Caldanaro, R.J., Aucoin, D., and Glickman, L.T. (2006). Canine Leptospirosis, United States, 2002–2004. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 501–503.
- Morand, S., Jittapalapong, S., and Kosoy, M. (2015). Rodents as hosts of infectious diseases: biological and ecological characteristics. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 15, 1–2.
- Morens, D.M., Folkers, G.K., and Fauci, A.S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430, 242–249.
- Mosallanejad, B., Avizeh, R., Jalali, M.H.R., and Hamidinejat, H. (2012). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Among Wild Rats (*Rattus rattus*) in Ahvaz District, Southwestern Iran. *Jundishapur J Microbiol* 5, 332–335.
- Murphy, F.A. (2008). Emerging zoonoses: The challenge for public health and biodefense. *Prev. Vet. Med.* 86, 216–223.
- Muslich LT, Villanueva SY, Amran MY, Segawa T, Saito M, Yoshida S. (2015) Characterization of *Leptospira* infection in suckling and weaning rat pups. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 38:47–55.
- Myint, K.S.A., Endy, T.P., Gibbons, R.V., Laras, K., Mammen, M.P., Sedyaningsih, E.R., Seriwatana, J., Glass, J.S., Narupiti, S., and Corwin, A.L. (2006). Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1581–1583.
- Nally, J.E., Monahan, A.M., Miller, I.S., Bonilla-Santiago, R., Souda, P., and Whitelegge, J.P. (2011). Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the urine of reservoir hosts of leptospirosis. *PloS One* 6, e26046.
- Nielsen, E.M., Skov, M.N., Madsen, J.J., Lodal, J., Jespersen, J.B., and Baggesen, D.L. (2004). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6944–6947.
- Ninove, L., Domart, Y., Vervel, C., Voinot, C., Salez, N., Raoult, D., Meyer, H., Capek, I., Zandotti, C., and Charrel, R.N. (2009). Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 781–784.
- Nkogwe, C., Raletobana, J., Stewart-Johnson, A., Suepaul, S., and Adesiyun, A. (2011). Frequency of Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Campylobacter* spp. in the Faeces of Wild Rats (*Rattus* spp.) in Trinidad and Tobago. *Vet. Med. Int.* 2011, 686923.
- Olsson, G.E., White, N., Ahlm, C., Elgh, F., Verlemys, A.-C., Juto, P., and Palo, R.T. (2002). Demographic factors associated with hantavirus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerg. Infect. Dis.* 8, 924–929.
- Palma, R.E., Polop, J.J., Owen, R.D., and Mills, J.N. (2012). Ecology of rodent-associated hantaviruses in the Southern Cone of South America: Argentina, Chile, Paraguay, and Uruguay. *J. Wildl. Dis.* 48, 267–281.
- Pereira, C., Barata, M., and Trigo, A. (2014). Social cost of leptospirosis cases attributed to the 2011 disaster striking Nova Friburgo, Brazil. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 11, 4140–4157.

- Perrocheau, A., and Perolat, P. (1997). Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year survey. *Eur. J. Epidemiol.* 13, 161–167.
- Perry, R.D., and Fetherston, J.D. (1997). *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 35–66.
- Picardeau, M. (2015). Données épidémiologiques sur la leptospirose humaine en France (Clermont-Ferrand).
- Pozio, E., Hoberg, E., La Rosa, G., and Zarlenga, D.S. (2009). Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 9, 606–616.
- Prescott, J.F., McEwen, B., Taylor, J., Woods, J.P., Abrams-Ogg, A., and Wilcock, B. (2002). Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario: recent findings. *Can. Vet. J. Rev. Vét. Can.* 43, 955–961.
- Psaroulaki, A., Antoniou, M., Toumazos, P., Mazeris, A., Ioannou, I., Chochlakis, D., Christophi, N., Loukaides, P., Patsias, A., Moschandrea, I., *et al.* (2010). Rats as indicators of the presence and dispersal of six zoonotic microbial agents in Cyprus, an island ecosystem: a seroepidemiological study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104, 733–739.
- Purcell, R.H., Engle, R.E., Rood, M.P., Kabrane-Lazizi, Y., Nguyen, H.T., Govindarajan, S., St Claire, M., and Emerson, S.U. (2011). Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2216–2222.
- Radford, A.D., Chapman, D., Dixon, L., Chantrey, J., Darby, A.C., and Hall, N. (2012). Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J. Gen. Virol.* 93, 1853–1868.
- Raghavan, R., Brenner, K., Higgins, J., Van der Merwe, D., and Harkin, K.R. (2011). Evaluations of land cover risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002–2009). *Prev. Vet. Med.* 101, 241–249.
- Raghavan, R.K., Brenner, K.M., Higgins, J.J., Shawn Hutchinson, J.M., and Harkin, K.R. (2012). Neighborhood-level socioeconomic and urban land use risk factors of canine leptospirosis: 94 cases (2002–2009). *Prev. Vet. Med.* 106, 324–331.
- Randolph, S.E. (2003). Faune, climat et politique : Causes possibles aux récents accroissements des zoonoses à tiques. *Ann. Inst. Pasteur Actual.* 109–120.
- R Ceruti, O.S. (2001). *Capillaria hepatica* infection in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) from the urban area of Milan, Italy. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48, 235–240.
- Reis, R.B., Ribeiro, G.S., Felzemburgh, R.D.M., Santana, F.S., Mohr, S., Melendez, A.X.T.O., Queiroz, A., Santos, A.C., Ravines, R.R., Tassinari, W.S., *et al.* (2008). Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e228.
- Reuter, G., Fodor, D., Forgách, P., Kátai, A., and Szucs, G. (2009). Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 44, 277–281.
- Richomme, C., Afonso, E., Tolon, V., Ducrot, C., Halos, L., Alliot, A., Perret, C., Thomas, M., Boireau, P., and Gilot-Fromont, E. (2010). Seroprevalence and factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild boar (*Sus scrofa*) in a Mediterranean island. *Epidemiol. Infect.* 138, 1257–1266.
- Richomme, C., Perret, C., Kodjo, A., Blaga, R., Madani, N., Boucher, J., Umhang, G., Guedon, G., and Boué, F. (2012). Aquatic rodent: which zoonotic threat ? (Lyon).
- Rojas, P., Monahan, A.M., Schuller, S., Miller, I.S., Markey, B.K., and Nally, J.E. (2010). Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 29, 1305–1309.



- Ruffino, L., Russell, J., and Vidal, E. (2013). Anthropogenic subsidies mitigate environmental variability for insular rodents. *Oecologia* 172, 737–749.
- Russell, J.C., and Ruffino, L. (2012). The influence of spatio-temporal resource fluctuations on insular rat population dynamics. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 767–774.
- Russell, S., Meadow, K., and Russel, R. (2009). *Microarray Technology in Practice* (Cambridge).
- Saisongkorh, W., Rolain, J.-M., Suputtamongkol, Y., and Raoult, D. (2009). Emerging Bartonella in humans and animals in Asia and Australia. *J. Med. Assoc. Thai. Chotmaihet Thangphaet* 92, 707–731.
- Sarkar, U., Nascimento, S.F., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalofonos, I., Kalafanos, I., Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., *et al.* (2002). Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 605–610.
- Sauvage, F., Penalba, C., Vuillaume, P., Boue, F., Coudrier, D., Pontier, D., and Artois, M. (2002). Puumala hantavirus Infection in Humans and in the Reservoir Host, Ardennes Region, France. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1509–1511.
- La Scola, B., Bui, L.T.M., Baranton, G., Khamis, A., and Raoult, D. (2006). Partial rpoB gene sequencing for identification of Leptospira species. *FEMS Microbiol. Lett.* 263, 142–147.
- Shvartsblat, S., Kochie, M., Harber, P., and Howard, J. (2004). Fatal rat bite fever in a pet shop employee. *Am. J. Ind. Med.* 45, 357–360.
- Silpapojakul, K., Chayakul, P., Krisanapan, S., and Silpapojakul, K. (1993). Murine typhus in Thailand: clinical features, diagnosis and treatment. *Q. J. Med.* 86, 43–47.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A., and Teixeira, P. (2011). Campylobacter spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front. Microbiol.* 2, 200.
- Slack, A.T., Symonds, M.L., Dohnt, M.F., and Smythe, L.D. (2006). Identification of pathogenic Leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.* 6, 95.
- Smythe, L.D., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Suputtamongkol, Y., Tiengrim, S., Dohnt, M.F., Symonds, M.L., Slack, A.T., Apiwattanaporn, A., Chueasuwanchai, S., *et al.* (2009). The Microscopic Agglutination Test (MAT) Is an Unreliable Predictor of Infecting Leptospira Serovar in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 695–697.
- Soares, T.S.M., Latorre, M. do R.D. de O., Laporta, G.Z., and Buzzar, M.R. (2010). Spatial and seasonal analysis on leptospirosis in the municipality of São Paulo, Southeastern Brazil, 1998 to 2006. *Rev. Saúde Pública* 44, 283–291.
- Socolovschi, C., Angelakis, E., Renvoisé, A., Fournier, P.-E., Marié, J.L., Davoust, B., Stein, A., and Raoult, D. (2011). Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 15, e710–e715.
- Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H., and Mackenzie, F.M. (2012). Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 273–282.
- Stokes, J.E., Kaneene, J.B., Schall, W.D., Kruger, J.M., Miller, R., Kaiser, L., and Bolin, C.A. (2007). Prevalence of serum antibodies against six Leptospira serovars in healthy dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 230, 1657–1664.
- Sykes, J., Hartmann, K., Lunn, K., Moore, G., Stoddard, R., and Goldstein, R. (2011). 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 1–13.

- Tassinari, W.S., Pellegrini, D.C.P., Sá, C.B.P., Reis, R.B., Ko, A.I., and Carvalho, M.S. (2008). Detection and modelling of case clusters for urban leptospirosis. *Trop. Med. Int. Health* 13, 503–512.
- Taylor, L.H., Latham, S.M., and Woolhouse, M.E. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 356, 983–989.
- Taylor, P.J., Arntzen, L., Hayter, M., Iles, M., Frean, J., and Belmain, S. (2008). Understanding and managing sanitary risks due to rodent zoonoses in an African city: beyond the Boston Model. *Integr. Zool.* 3, 38–50.
- Thi, N.V., Nguyen, V.D., Praet, N., Claes, L., Gabriël, S., Huyen, N.T., and Dorny, P. (2014). *Trichinella* infection in wild boars and synanthropic rats in northwest Vietnam. *Vet. Parasitol.* 200, 207–211.
- Thiermann, A.B. (1980). Effect of cyclophosphamide treatment on clinical and serologic response of rats to infection with *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*. *Am. J. Vet. Res.* 41, 1655–1658.
- Thiermann, A.B. (1981). The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *J. Wildl. Dis.* 17, 39–43.
- Thompson, R.C.A., Kutz, S.J., and Smith, A. (2009). Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 678–693.
- Torgerson, P.R., and Mastroiacovo, P. (2013). The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* 91, 501–508.
- Trap, D. (1988). Les petits mammifères sauvages, source de leptospirose. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 7, 885–892.
- Traweger, D., and Slotta-Bachmayr, L. (2005). Introducing GIS-modelling into the management of a brown rat (*Rattus norvegicus* Berk.) (Mamm. Rodentia Muridae) population in an urban habitat. *J. Pest Sci.* 78, 17–24.
- Traweger, D., Travnitzky, R., Moser, C., Walzer, C., and Bernatzky, G. (2006). Habitat preferences and distribution of the brown rat (*Rattus norvegicus* Berk.) in the city of Salzburg (Austria): implications for an urban rat management. *J. Pest Sci.* 79, 113–125.
- Tresse, L., Rubeaux, D., Kodjo, A., André-Fontaine, G., and Mascarón, L. (2009). Enquête sur l'infection des bovins par les leptospires en région ouest. p. 274.
- Tucunduva de Faria, M., Athanazio, D.A., Gonçalves Ramos, E.A., Silva, E.F., Reis, M.G., and Ko, A.I. (2007). Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J. Comp. Pathol.* 137, 231–238.
- Umenai, T., Lee, H.W., Lee, P.W., Saito, T., Toyoda, T., Hongo, M., Yoshinaga, K., Nobunaga, T., Horiuchi, T., and Ishida, N. (1979). Korean haemorrhagic fever in staff in an animal laboratory. *Lancet* 1, 1314–1316.
- Vaheri, A., Henttonen, H., Voutilainen, L., Mustonen, J., Sironen, T., and Vapalahti, O. (2013). Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. *Rev. Med. Virol.* 23, 35–49.
- Vanasco, N.B., Sequeira, M.D., Sequeira, G., and Tarabla, H.D. (2003). Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Prev. Vet. Med.* 60, 227–235.
- Venkataraman, K.S., and Nedunchellian, S. (1992). Epidemiology of an outbreak of leptospirosis in man and dog. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 243–247.

- Viana, M., Mancy, R., Biek, R., Cleaveland, S., Cross, P.C., Lloyd-Smith, J.O., and Haydon, D.T. (2014). Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends Ecol. Evol.* 29, 270–279.
- Villanueva, S.Y.A.M., Ezoe, H., Baterna, R.A., Yanagihara, Y., Muto, M., Koizumi, N., Fukui, T., Okamoto, Y., Masuzawa, T., Cavinta, L.L., *et al.* (2010). Serologic and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 889–898.
- Vinetz, J.M., Glass, G.E., Flexner, C.E., Mueller, P., and Kaslow, D.C. (1996). Sporadic urban leptospirosis. *Ann. Intern. Med.* 125, 794–798.
- Vogel, S., Sárdy, M., Glos, K., Korting, H.C., Ruzicka, T., and Wollenberg, A. (2012). The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: transmission by infected pet rats. *Acta Derm. Venereol.* 92, 126–131.
- Vogt, C. (2010). Puzzling ambiguity during a sanitary control (Helsinki).
- Walter, G., Botelho-Nevers, E., Socolovschi, C., Raoult, D., and Parola, P. (2012). Murine typhus in returned travelers: a report of thirty-two cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 1049–1053.
- Wang, T.T., and Palese, P. (2009). Unraveling the mystery of swine influenza virus. *Cell* 137, 983–985.
- Wang, Q.-P., Lai, D.-H., Zhu, X.-Q., Chen, X.-G., and Lun, Z.-R. (2008). Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect. Dis.* 8, 621–630.
- Wang, Q.-P., Wu, Z.-D., Wei, J., Owen, R.L., and Lun, Z.-R. (2012). Human *Angiostrongylus cantonensis*: an update. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 31, 389–395.
- Ward, M.P., Glickman, L.T., and Guptill, L.E. (2002). Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 53–58.
- Ward, M.P., Guptill, L.F., Prahl, A., and Wu, C.C. (2004). Serovar-specific prevalence and risk factors for leptospirosis among dogs: 90 cases (1997-2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224, 1958–1963.
- Watson, J.T., Gayer, M., and Connolly, M.A. (2007). Epidemics after natural disasters. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1–5.
- Webster, J.P. (1994). Prevalence and transmission of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. *Parasitology* 108 ( Pt 4), 407–411.
- Webster, J.P., and Macdonald, D.W. (1995). Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Parasitology* 111 ( Pt 3), 247–255.
- Weigler, B.J., Di Giacomo, R.F., and Alexander, S. (2005). A national survey of laboratory animal workers concerning occupational risks for zoonotic diseases. *Comp. Med.* 55, 183–191.
- WEIHONG, J., VEITCH, C., and CRAIG, J. (1999). An evaluation of the efficiency of rodent trapping methods: the effect of trap arrangement, cover type, and bait. 23, 45–51.
- Weinberger, D., Baroux, N., Grangeon, J.-P., Ko, A.I., and Goarant, C. (2014). El Niño Southern Oscillation and Leptospirosis Outbreaks in New Caledonia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8.
- Widén, F., Ayrál, F., Artois, M., Olofson, A.-S., and Lin, J. (2014). PCR detection and analysis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats. *Virol. J.* 11, 90.
- Williams, E.S., and Barker, I.K. (2001). *Infectious Diseases of Wild Mammals* (Iowa State University Press.).
- Yanagihara, R. (1990). Hantavirus Infection in the United States: Epizootiology and Epidemiology. *Rev. Infect. Dis.* 12, 449–457.

- Yanagihara, Y., Villanueva, S.Y.A.M., Yoshida, S.-I., Okamoto, Y., and Masuzawa, T. (2007). Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 399–413.
- Yin, C.-C., He, Y., Zhou, D.-H., Yan, C., He, X.-H., Wu, S.-M., Zhou, Y., Yuan, Z.-G., Lin, R.-Q., and Zhu, X.Q. (2010). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Rats in Southern China. *J. Parasitol.* 96, 1233–1234.
- Yokoyama, E., Maruyama, S., Kabeya, H., Hara, S., Sata, S., Kuroki, T., and Yamamoto, T. (2007). Prevalence and Genetic Properties of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Definitive Phage Type 104 Isolated from *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* House Rats in Yokohama City, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2624–2630.
- Zeller, H., Georges-Courbot, M.-C., Schuffenecker, I., and Mailles, A. (2005). La fièvre hémorragique avec syndrome rénal en France en 2001-2003 : aspects épidémiologiques. *Surveillance nationale des maladies infectieuses*, 2001-2003.
- Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L., and Bishai, W.R. (2005). Community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect. Dis.* 5, 275–286.
- Zilber, A.-L., Picardeau, M., Ayral, F., Artois, M., Demont, P., Kodjo, A., and Djelouadji, Z. (2014). High-resolution typing of *Leptospira interrogans* strains by multispacer sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 52, 564–571.

## Annexe 1

### Monographies des Zoonoses Associées aux Rats

#### 1.1 Les agents de zoonoses bactériennes

##### 1.1.1 *Leptospira interrogans*

###### **État des lieux**

*Leptospira interrogans*, bactérie spirochète gram négative, est considérée comme le pathogène zoonotique le plus répandu dans le monde (Evangelista and Coburn, 2010). Ces bactéries dont le réservoir principal est le rat (*Rattus spp.*) peuvent infecter tous les mammifères y compris l'Homme (Adler, 2010). Elles sont responsables de plus de 500 000 cas sévères de leptospirose humaine annuellement. Le caractère ré-émergent de la maladie est décrit dans les pays en voie de développement comme dans les pays industrialisés (Jansen et al., 2005; Meites et al., 2004) et en particulier dans le milieu urbain (Jansen et al., 2005). Les conséquences épidémiologique et clinique de la maladie en font un enjeu majeur de santé publique.

###### **Agent**

*Leptospira interrogans* au sens large regroupe les espèces de leptospires pathogènes et se distingue de *Leptospira biflexa* qui rassemble les espèces saprophytes. Bien que tous les mammifères puissent être infectés par toutes les leptospires (Adler and de la Peña Moctezuma, 2010), ces dernières ont une spécificité d'hôte et leur caractérisation a un intérêt épidémiologique. Classiquement, les bactéries du groupe pathogène *Leptospira interrogans* se répartissent en plus de 300 sérovars regroupés parmi 25 sérogroupes selon leur proximité antigénique (Kmety and Dikken H, 1993). Une autre classification dite génomique est basée sur l'homologie génétique et a permis d'identifier 9 espèces pathogènes ou « genomospecies » (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. astonii*, *L. Kmetyi*, *L. mayottensis*) dont la correspondance avec les sérogroupes n'est pas systématique (Picardeau, 2013).

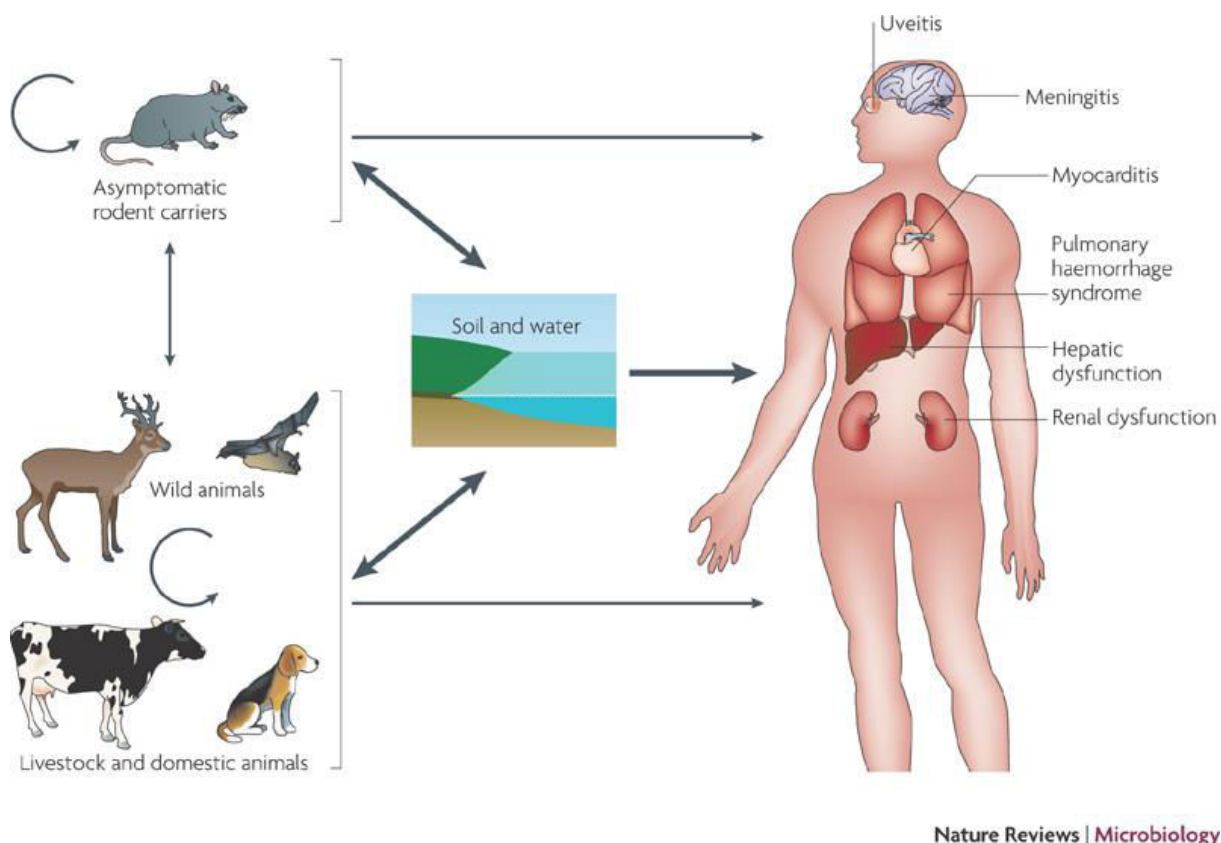
###### **Cycle de transmission et d'infection**

La Figure 1 décrit les cycles de transmission et d'infection leptospirosique. Les mammifères excrètent les leptospires par les urines et sont des réservoirs de l'infection humaine. Les rongeurs maintiennent les agents leptospirosiques dans les environnements sylvaque et domestique. Chez ces espèces réservoirs, l'infection est associée à un portage chronique et asymptomatique (Guerra, 2009; Ko et al., 2009). *Leptospira spp.* ainsi présent dans l'environnement peut infecter les animaux de rente, les

animaux domestiques et la faune sauvage avec des tableaux cliniques variés et des états de portage. Les syndromes fébrile, d'insuffisance hépatique ou rénal, d'hémorragie pulmonaire canin, d'uvéite canin et équin et abortif (souvent rapporté chez les animaux de rente) sont décrits (Greenlee et al., 2004; Levett, 2001; Sykes et al., 2011). Le maintien de la leptospirose dans ces populations est lié à une exposition constante aux rongeurs ou à une transmission entre congénères.

La leptospirose est transmise à l'Homme par contact direct avec les animaux réservoirs ou par l'exposition à un environnement (sol et eau) contaminé par leurs urines. Les leptospires pénètrent l'organisme par des plaies cutanées ou les muqueuses, atteignent le système sanguin et se distribuent dans les tissus. En début d'infection, la phase bactériémique est associée à de la fièvre puis l'infection progresse et peut provoquer des manifestations multi systémiques sévères comme une insuffisance hépatique associée à une jaunisse, une insuffisance rénale, un syndrome d'hémorragie pulmonaire, une myocardite et une méningoencéphalite (Bharti et al., 2003; Evangelista and Coburn, 2010; Ko et al., 2009; Meerburg et al., 2006). Le taux de mortalité est de 5 à 15% dans les cas d'insuffisance hépatique et/ou rénale (Ko et al., 1999; Meerburg et al., 2009; Yanagihara et al., 2007) et peut atteindre 50% dans le syndrome d'hémorragie pulmonaire (Ko et al., 2009). Lors des manifestations cliniques, les bactéries peuvent être éliminées ou se maintenir dans des zones immunologiquement adaptées comme les tubules rénaux et l'humeur vitrée de l'œil. Respectivement, une excrétion urinaire et une uvéite peuvent apparaître des mois après l'exposition (Ko et al., 2009). Toutefois, l'Homme est un hôte accidentel et n'excrète pas suffisamment de bactéries pour avoir un rôle de réservoir.

Les rongeurs, en particulier le rat, sont les réservoirs principaux de l'infection humaine (Ko et al., 2009). Les cas de transmission du chien à l'Homme sont anecdotiques et peu documentés (Meyer et al., 1938). Bien que les canidés et les bovidés soient des hôtes accidentels de certains sérovars, ils peuvent être hôte réservoir d'autres sérovars, canicola et hardjo respectivement. Les animaux domestiques sont donc des sources potentielles pour l'Homme (Brod et al., 2005; Dreyfus et al., 2014).



**Figure 17 - Cycle de transmission et d'infection leptospirosique**

(Ko et al., 2009)

## Épidémiologie

Les bactéries peuvent survivre en dehors de leur hôte lorsque les conditions environnementales sont favorables (i.e. climat chaud et humide). Cet effet du climat serait responsable de la distribution hétérogène de l'incidence de la leptospirose humaine (Levett, 2001). L'estimation de l'incidence de la leptospirose humaine est de 0.1 à 1/100 000 personnes-an en zone tempérée et de 10 à 100/100 000 personnes-an en zone tropicale et subtropicale (Bharti et al., 2003). Elle est la plus élevée en Asie du sud-est, Océanie, dans le sous-continent indien, les caraïbes et en Amérique latine (Evangelista and Coburn, 2010).

Bien que la maladie ait souvent été associée à des activités de plein air et impliquant l'eau (Moinet et al., 2010; Monahan et al., 2009b; Morgan et al., 2002), l'environnement urbain est de plus en plus associé aux cas humains (Bharti et al., 2003; Evangelista and Coburn, 2010; Guerra, 2009; Jansen et al., 2005; Ko et al., 2009; Socolovschi et al., 2011). En effet, *Leptospira spp* est ubiquitaire dans les populations de rat (Bharti et al., 2003; Guerra, 2009; Ko et al., 2009; Meerburg et al., 2009) et leur synanthropie (i.e. avec l'Homme) en fait la source la plus fréquente de leptospirose humaine. L'infection humaine est le plus souvent associée au sérovar icterohaemorrhagiae pour lequel le rat est

principalement décrit comme porteur asymptomatique (Ko et al., 2009). Certaines études avancent que les sérovars portés par le rat seraient plus virulents que les sérovars communément portés par les autres espèces (Bishara et al., 2002) alors que d'autres ne mettent pas en évidence ces différences de virulence (Perrocheau and Perolat, 1997).

### **Diagnostic de laboratoire**

Le diagnostic clinique de la leptospirose est complexe du fait de la diversité des symptômes liés à la fois aux souches infectantes et aux espèces infectées. Les tests diagnostiques sont divisés en deux catégories, la détection directe (mise en évidence de la bactérie par culture bactériologique ou histologiquement après coloration Warthin-Stary, mise en évidence d'ADN par amplification de fragments spécifiques de leptospires) ou indirecte (détection des anticorps anti leptospire par sérologie par le test de micro agglutination -MAT- ou par ELISA). L'isolement bactérien après la mise en culture de prélèvement clinique ou la sérologie avec le MAT sont les tests de référence mais impliquent des techniques laborieuses et réservées aux laboratoires spécialement équipés. Pour pallier au manque de sensibilité de ces techniques, en particulier en début d'infection, des tests utilisant la PCR ont été développés. Ils sont basés sur l'amplification d'un ou de plusieurs gènes cibles universels tels que 16S, ligA, rrs, gyrB, lipL32, rpoB et secY et sont spécifiques des bactéries pathogènes. Cependant ces méthodes ne permettent pas d'identifier l'espèce ou le séro groupe, leur usage en épidémiologie est donc limité.

#### *1.1.2 Yersinia pestis*

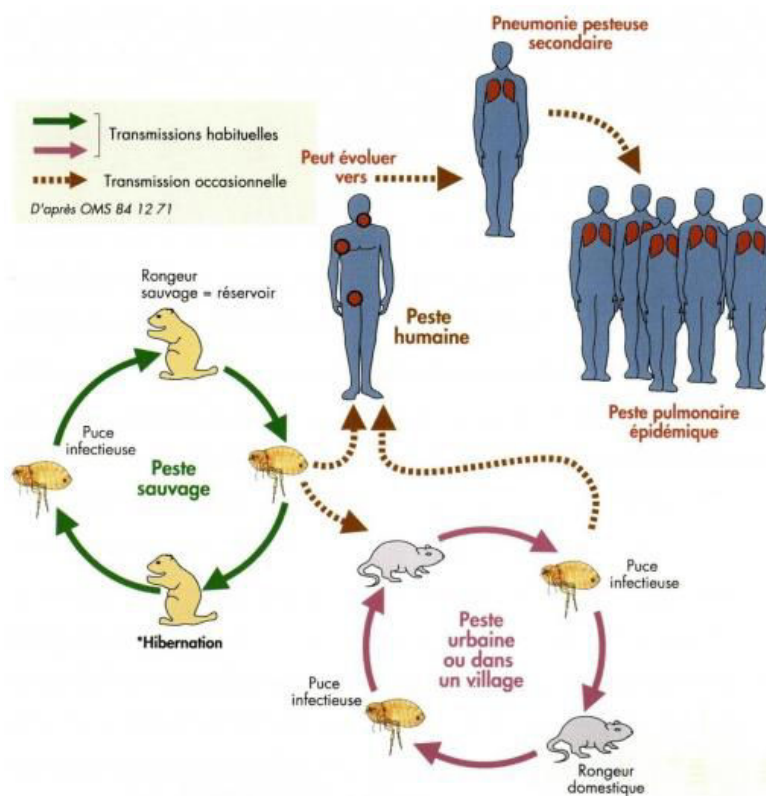
### **Agent et cycle de transmission**

*Yersinia pestis*, bacille gram négatif (Perry and Fetherston, 1997; Zietz and Dunkelberg, 2004) est l'agent étiologique de la peste noire dont le rat surmulot (*Rattus norvegicus*) et le rat noir (*Rattus rattus*) sont les sources principales (Chanteau et al., 1998). La bactérie est transmise de rat à rat et du rat à l'Homme via les puces (Perry and Fetherston, 1997). *Xenopsylla cheopsis* est le vecteur le plus commun dans les villes (Chanteau et al., 1998; Meerburg et al., 2009; Monecke et al., 2009; Perry and Fetherston, 1997) bien que de nombreuses puces notamment du genre *Xenopsylla* puissent être vecteur de la bactérie (Zimba et al., 2011). Lorsqu'une puce prend un repas de sang sur un rat infecté, la bactérie pénètre dans le tube digestif de la puce et s'y multiplie formant une obstruction en amont de l'estomac (Monecke et al., 2009; Perry and Fetherston, 1997). Cette obstruction entraîne la faim de la puce qui pique de façon répétée dans le but de s'alimenter. Des bactéries sont transmises à chaque piqure, responsable de l'infection des hôtes (Monecke et al., 2009; Perry and Fetherston, 1997).

Le rat est le principal réservoir de *Y pestis* (Boisier et al., 1997; Chanteau et al., 1998; Perry and Fetherston, 1997; Rahelinirina et al., 2010) bien que l'infection lui soit fatale. Pour cette raison, le rat



n'est probablement pas l'hôte de maintenance de la bactérie (Perry and Fetherston, 1997). D'autres espèces de rongeurs, moins susceptibles, permettraient le maintien de l'infection sous une forme endémique et la transmission bactérienne de ces foyers vers les rats serait à l'origine d'épidémie chez ces derniers puis chez l'Homme (Perry and Fetherston, 1997).



**Figure 18 – Cycle de transmission**

parmi les puces (*Xenopsylla*), les rongeurs dont les rats et l'Homme (OMS 84 12 11).

## Clinique

Lors d'une piqûre par une puce infectée, les bactéries introduites rejoignent les nœuds lymphatiques et s'y multiplient entraînant leur inflammation et le bubon caractéristique de la maladie (Perry and Fetherston, 1997; Zietz and Dunkelberg, 2004). La bactérie se dissémine ensuite dans l'organisme (Perry and Fetherston, 1997). Le tableau clinique de la peste implique de la fièvre, des douleurs et des malaises qui peuvent évoluer en sepsis fatal (Zietz and Dunkelberg, 2004). Le taux de mortalité peut atteindre 20% dans les pays en voie de développement où l'accès au soin est limité (Chanteau et al., 2000). Bien que la forme bubonique soit la plus commune, la forme pulmonaire avec une transmission inter humaine peut apparaître dans le pic de l'épidémie (Chanteau et al., 2000; Keeling and Gilligan, 2000).

## **Épidémiologie**

La persistance de la maladie dépend de la présence de l'hôte mais aussi d'un climat favorable à l'activité des puces et à la multiplication bactérienne. Ces conditions particulières expliqueraient la distribution des zones d'enzootie, limitées à l'Afrique, l'Asie du sud-est et l'Amérique du sud (Perry and Fetherston, 1997). L'incidence moyenne est de 2270 cas par an et la majorité des cas sont issus des pays d'Afrique incluant Madagascar (OMS 2010). La dernière épidémie (novembre 2014) à Madagascar fait état de 119 malades et 40 morts. L'OMS souligne le risque de diffusion de la maladie dans les villes avoisinantes.

## **Diagnostic de laboratoire**

Le test de référence pour la détection de *Y. pestis* est l'isolement de la bactérie et sa mise en évidence par l'antigène F1 (Fraction 1 de l'antigène capsulaire) par ELISA. Ces tests sont spécifiques mais manquent de sensibilité notamment dans les pays où la peste est endémique. Dans ces derniers, une faible charge bactérienne relative à la contamination ou la détérioration des échantillons, serait responsable de faux négatifs. Une alternative est l'immuno- chromatographie à flux latéral sur bandelette qui détecte l'antigène F1 tout en étant rapide, sensible et spécifique dans les zones d'endémie (Chanteau et al., 2003). Toutefois, l'antigène F1 peut être absent dans certains cas, empêchant la détection de *Y. pestis* (Leal-Balbino et al., 2004). Les approches moléculaires (e.g. PCR) sont spécifiques cependant la culture reste nécessaire pour réaliser l'antibiogramme ou dans un but de génotypage (Riehm et al., 2011).

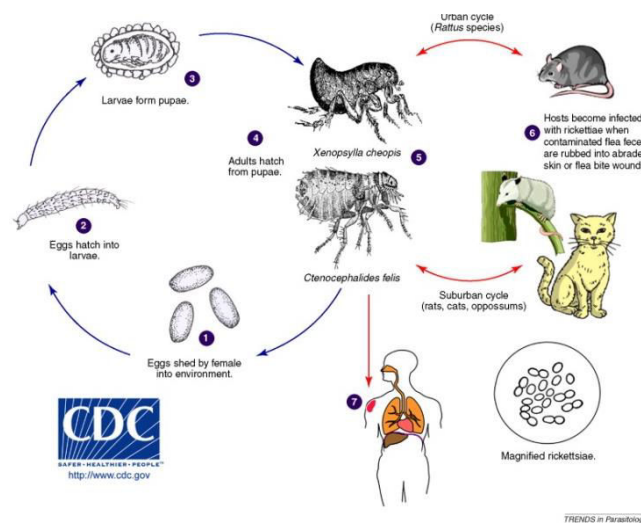
### **1.1.3 *Rickettsia typhi***

## **Agent et cycle de transmission**

*Rickettsia typhi* est une bactérie gram négative et intra cellulaire, spécifique des globules blancs (Civen and Ngo, 2008) et circulerait dans toutes les populations de rat du monde (Azad et al., 1997; Civen and Ngo, 2008). Elle est transmise de rat à rat et du rat à l'Homme via *Xenopsylla cheopis* (Civen and Ngo, 2008; Meerburg et al., 2009). La bactérie est ingérée par la puce au cours d'un repas sur un rat infecté, la bactérie se multiplie dans le tube digestif puis est excrétée dans les fèces (Civen and Ngo, 2008). L'Homme s'infecte lorsque les fèces contaminées sont inoculées via une piqûre ou par grattage et abrasion de la peau (Civen and Ngo, 2008). Contrairement à *Y. pestis*, l'infection ne se fait pas au détriment de son hôte, elle peut être maintenue chez le rat de façon asymptomatique et être transmise de façon verticale (Merhej and Raoult, 2011).

Classiquement, le cycle de transmission entre le rat, réservoir et la puce, vecteur est décrit (Civen and Ngo, 2008). Une prévalence de 13% chez le rat est rapportée (Laudisoit et al., 2014). Cependant, à proximité de cas humains, des séroprévalences plus élevées chez le chat (90%) et le raton laveur

(42%) que chez le rat (2.8%) ont été décrites (Sorvillo et al., 1993). Cette étude en Californie suggère la présence d'autres réservoirs.



**Figure 19 – Cycle de transmission de *R. typhi***  
**dont le réservoir classiquement décrit est le rat mais pourrait faire intervenir d'autres espèces**  
**(McElroy et al., 2010).**

## Clinique

*R. typhi* cause le typhus murin chez l'Homme qui est généralement une maladie auto limitante (Azad et al., 1997; Civen and Ngo, 2008) dont le tableau clinique inclut de la fièvre, de la fatigue, une myalgie, une arthralgie, des nausées, des vomissements et une éruption cutanée caractéristique (Civen and Ngo, 2008; Gray et al., 2007). La mortalité est de 1% avec un traitement antibiotique adapté et de 4% sans traitement (Azad et al., 1997; Civen and Ngo, 2008).

## Épidémiologie

Au Bangladesh, zone d'endémie, une étude de séroprévalence a rapporté 67% d'exposition récente chez l'Homme (Maude et al., 2014). Le typhus murin est cliniquement peu spécifique et son incidence est probablement sous-estimée (Azad et al., 1997). Cette maladie est commune aux voyageurs ayant séjourné en zone d'endémie, principalement l'Asie et l'Afrique (Walter et al., 2012). Suite à un cas ayant séjourné sur l'île de la Réunion, huit (8) patients infectés entre 2011 et 2013 ont récemment été mis en évidence sur l'île, suggérant une émergence de la maladie ou le sous diagnostic du typhus murin jusque-là (Balleydier et al., 2015). Au Texas (États-Unis), des résurgences ont récemment été associées à cette maladie (Blanton et al., 2015).

## Diagnostic de laboratoire

Les conditions nécessaires pour isoler et cultiver *R. typhi* requièrent l'équipement d'un laboratoire spécialisé (Civen and Ngo, 2008). Le diagnostic par culture bactérienne est donc contraignant. La sérologie est la technique la plus utilisée pour le diagnostic cependant des réactions croisées entre rickettsies sont possibles. Un résultat positif demande donc une confirmation du diagnostic par PCR (Azad et al., 1997). Par ailleurs, les analyses moléculaires sont peu sensibles (48%) lorsque la charge bactérienne est faible et peuvent entraîner des résultats faussement négatifs (Sabine Dittrich, 2013).

### 1.1.4 *Bartonella* spp.

#### Agents et cycle de transmission

*Bartonella* spp est un coccobacille Gram négatif qui infecte les hématies (Boulouis et al., 2005; Saisongkorh et al., 2009) et est responsable de bartonelloses, maladies émergentes et ré-émergentes dans le monde. Une trentaine d'espèce de bartonelles sont décrites à ce jour. Ce nombre semble augmenter rapidement au fil des études (Breitschwerdt and Kordick, 2000; Saisongkorh et al., 2009). Sept espèces ont été décrites dans le cadre des infections humaines, la majorité étant due à *B. henselae*, *B. quintana* et *B. bacilliformis* (Just et al., 2008).

De nombreux mammifères peuvent être réservoir de la bactérie et chaque espèce bactérienne semble avoir un hôte naturel chez lequel les germes peuvent impliquer une bactériémie asymptomatique. Le rat surmulot peut être infecté par différentes espèces *B. elizabethae*, *B. trobocorum*, *B. rochalimae*, *B. phocensis* et *B. rattimassiliensis* (Billeter et al., 2011) avec de possibles coïnfections (Ellis et al., 1999; Inoue et al., 2008). La répartition des populations de rats infectés est probablement mondiale (Boulouis et al., 2005; Saisongkorh et al., 2009). Cependant, l'importance de leur rôle de réservoir dans les infections humaines n'est pas connue (Meerburg et al., 2009) et les cas potentiellement issus de rats sont limités (Boulouis et al., 2005). En particulier, la source des cas d'endocardites associés à *B. elizabethae* et de fièvres associés à *B. rochalimae* (Breitschwerdt and Kordick, 2000; Saisongkorh et al., 2009) n'est pas clairement identifiée (Boulouis et al., 2005). La transmission de rat à rat et de rat à Homme serait vectorielle via les puces (Breitschwerdt and Kordick, 2000; Kordick et al., 1997; Saisongkorh et al., 2009; Tsai et al., 2011).

#### Clinique

La sévérité de la maladie varie d'une infection bénigne à un pronostic vital engagé et dépend du statu immunitaire du patient. Le tableau clinique associé à l'infection est protéiforme et inclue une lymphadénopathie, une bactériémie, une endocardite et/ou la colonisation des tissus responsable d'une angiomasose bacillaire et d'une péliose hépatique (Angelakis et al., 2014).

## **Épidémiologie**

L'incidence de la maladie n'est pas rapportée. Toutefois, deux études de prévalence rapportent 4% de séropositivité en Suède, chez des personnes cliniquement saines (Holmberg et al., 1999) et 30% en France (population cliniquement saines de sans-abris) (Brouqui et al., 1999).

## **Diagnostic de laboratoire**

L'isolement d'une *Bartonella* spp. dans un prélèvement reste la méthode diagnostique de référence. Compte tenu de la difficulté de mise en œuvre et de l'apparition lente des colonies (5 à 15 jours) (Chomel, 2004), le diagnostic moléculaire par PCR est devenu la méthode de choix, surtout dans un prélèvement ganglionnaire en cas de maladie des griffes du chat. Bien que *B. henselae* soit l'agent le plus fréquemment rencontré, il faut disposer d'un jeu d'amorces et de sondes suffisamment larges pour pouvoir détecter d'autres espèces (*B. quintana*, *B. clarridgeiae*...) et éviter ainsi les réactions faussement négatives.

Le sérodiagnostic est réalisable en pratique courante pour *B. henselae* et éventuellement *B. quintana*. Toutefois, des réactions croisées avec d'autres Bartonnelles, *Chlamydia* et *Coxiella burnetii* sont possibles, limitant la spécificité de genre et d'espèce (Maurin et al., 1997). Il est essentiellement pratiqué par immunofluorescence indirecte. Le support antigénique est constitué, soit par une suspension bactérienne, soit par des cellules Vero infectées. Le titrage des anticorps IgG et IgM est possible et le diagnostic sérologique repose sur la mise en évidence d'une séroconversion. Des titres d'anticorps modérés peuvent persister chez des sujets en contact fréquent avec des chats impliquant une réaction faussement positive. Une réaction faussement négative peut être observée en cas d'infection par une Bartonelle dont la composition antigénique est éloignée de celle de *B. henselae* ou *B. quintana*. La sensibilité et la spécificité du sérodiagnostic sont comprises entre 85 et 90 % (Houpikian P., et al.).

### *1.1.5 Streptobacillus moniliformis et Spirillum minus*

#### **Agent et voies de transmission**

*Streptobacillus moniliformis* est un bacille gram négatif pléomorphe (Elliott, 2007; Gaastra et al., 2009) qui fait partie de la flore commensale de l'oropharynx du rat (*Rattus norvegicus* et *Rattus rattus*) et serait ubiquiste (Elliott, 2007; Gaastra et al., 2009; Meerburg et al., 2009). La bactérie est plus souvent transmise de façon directe par morsure d'un rat infecté causant la maladie «rat bite fever» et dans une moindre mesure de façon indirecte via de la nourriture contaminée causant la maladie «haverhill fever» (Elliott, 2007; Gaastra et al., 2009; Meerburg et al., 2009). Un second agent est impliqué dans le «rat bite fever» (ou Sodoku dans ce cas particulier), *Spirillum minus*, du genre

spirochete. Une quinzaine de cas a été rapporté depuis 1960. Sa prédominance en Asie est rapportée cependant, des cas sont décrits au Canada (Khatchadourian et al., 2010; Ojukwu and Christy, 2002).

Dans une étude au Japon, 92% des rats surmulots et 58% des rats noirs étaient porteurs du germe (Kimura et al., 2008). Plusieurs cas humains de « rat bite fever » n'étant pas associés à une morsure suggèrent qu'une proximité étroite entre le rat et l'homme serait suffisante pour la transmission du pathogène (Albedwawi et al., 2006). L'observation de nombreux cas rapportés chez les propriétaires de rats domestiqués est également en faveur d'une transmission directe suite à une proximité étroite (Graves and Janda, 2001). La bactérie a été isolée chez la souris, le chat et le chien cependant, n'étant pas des hôtes réservoirs, le risque de transmission associé à ces espèces est faible (Gaastra et al., 2009).

### **Clinique**

La majorité des infections à *S. moniliformis* seraient subcliniques et peu rapporté (Gaastra et al., 2009). Les formes cliniques sont associées à de la fièvre, des douleurs, des vomissements, une éruption cutanée et une polyarthrite. Une pharyngite et les vomissements sont plus souvent observés dans la forme « haverhill fever » (Elliott, 2007; Gaastra et al., 2009; Meerburg et al., 2009). Si l'infection n'est pas traitée, elle peut évoluer en septicémie fatale dans 7 à 13% des cas (Elliott, 2007; Gaastra et al., 2009; Meerburg et al., 2009) et la mort est souvent associée à une endocardite (Chen et al., 2007). Des souches ont été distinguées selon l'espèce hôte (*Rattus norvegicus* vs *Rattus rattus*), cependant la virulence semble identique (Kimura et al., 2008).

### **Épidémiologie**

L'incidence de la maladie n'est pas rapportée. D'après le « Centre of Disease Control » (CDC), les personnes à risque sont celles exposées aux rats (laborantins, propriétaires de rats domestiqués et vivant dans un habitat infesté).

### **Diagnostic de laboratoire**

L'isolement de la bactérie par la culture est le test diagnostique de référence cependant la culture est lente (7 jours) et fastidieuse (Chen et al., 2007; Elliott, 2007). La PCR, avec une sensibilité similaire à la culture peut être une alternative pour le diagnostic clinique (Boot et al., 2002). L'approche sérologique n'est pas développée chez l'Homme, en revanche elle est développée chez les rongeurs et notamment utilisée pour le dépistage chez les rongeurs de laboratoire. Un résultat sérologique positif est confirmé par PCR (Gaastra et al., 2009). Une étude récente utilisant la PCR et l'ionisation par électrobuliseur (ionisation electrospray) suivies par la spectrométrie de masse permet de détecter la bactérie à partir de liquide synovial de patient dont la culture était négative, la sensibilité est alors de 80% (Handke et al., 2010). Cependant, le développement de cette approche en routine est limité par son coût.

### 1.1.6 *Staphylococcus aureus* méticillino-résistant

#### **Agent et cycle de transmission**

*Staphylococcus Aureus* est une bactérie gram positive qui colonise les épithéliums de surface et cause des infections chez l'Homme (Stefani et al., 2012). La résistance à la Méthicilline est acquise via le gène relatif au facteur *mecA*, porté par des supports génétiques mobiles et qui confère à la bactérie une résistance à la plupart des bêta-lactames et à certaines autres classes d'antibiotiques (Cimolai, 2010; Stefani et al., 2012; Zetola et al., 2005). Malgré la large distribution géographique du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), le nombre de souches semble limité et serait le résultat d'une multiplication clonique (Oliveira et al., 2002).

La transmission de SARM est essentiellement interhumaine, cependant le SARM a été isolé chez les animaux domestiques (chats, chiens, chevaux et rat domestiqué) (van Duijkeren et al., 2004; Scott et al., 1988; Weese et al., 2005) et des études suggèrent la transmission des animaux domestiques à l'Homme (Graveland et al., 2011; van Loo et al., 2007; Pantosti, 2012). La question concernant le portage de SARM parmi les nuisibles tels que le rat et leur capacité à transmettre la bactérie aux populations a été soulevée récemment. Basée sur une méthode de séquençage du génome, une étude sur des rats de Vancouver (Canada) démontre que ces derniers sont porteurs (n=22/637) de différentes lignées de SARM préalablement décrites chez l'Homme ou les animaux de rente (Himsworth et al., 2014a). Toutefois, les voies d'acquisition du SARM chez les rats et le rôle de ces derniers en tant que réservoir de la bactérie pour l'Homme et les animaux domestiques restent à investiguer.

#### **Clinique**

Chez l'Homme, les infections cliniques par SARM sont souvent responsables d'infection de la peau et des tissus mous.

#### **Épidémiologie**

Depuis son émergence, le (SARM) prend de l'importance parmi les causes des infections nosocomiales (Stefani et al., 2012). Dans les années 2000 est apparu le SARM associé à la communauté (SARM-AC) qui, contrairement au SARM acquis dans les hôpitaux, est disséminé et cause des maladies dans la population générale en dehors de tout contexte médical et chez des personnes sans facteur de risque particulier comme l'immuno dépression (Cimolai, 2010; Stefani et al., 2012; Zetola et al., 2005). Un ou des clones de CA-SARM ont diffusé de manière indépendante et plus spécifique sur chaque continent (Europe, Amérique du Nord et Asie/Océanie) (Otter and French, 2010).

Bien que le SARM-AC soit largement répandu, l'incidence des maladies associées est plus importante chez les personnes socialement défavorisées par rapport à la population générale (Lloyd-Smith et al., 2010; Stefani et al., 2012; Young et al., 2004). Ce résultat est probablement lié à une santé altérée, un faible niveau d'hygiène, une surpopulation dans les refuges (Lloyd-Smith et al., 2010; Young et al., 2004).

### **Diagnostic de laboratoire**

La culture bactériologique de SARM implique un délai de 2 à 3 jours avant d'obtenir le résultat. Or une détection plus rapide est nécessaire pour la prise en charge appropriée du patient (traitement précoce, mesures sanitaires) (Kluytmans, 2007). Des tests rapides basés sur la détection du gène *mecA* par PCR ont une bonne sensibilité mais pèche par leur spécificité (valeur prédictive positive comprise entre 60% et 83%) (Stürenburg, 2009). Le gène *mecA* ne permet pas de différencier les SARM et les Staphylocoques coagulase-négatives, présent dans la flore commensale. Une approche PCR ciblant la région SCCmec (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*) est plus spécifique. Toutefois, la culture reste recommandée pour écarter d'éventuels faux positifs (Stürenburg, 2009).

#### *1.1.7 Staphylococcus pseudintermedius* méticillino-résistant

### **Agent et voies de transmission**

*Staphylococcus pseudintermedius* est une espèce coagulase positive parmi le groupe des staphylocoques intermedius. Préalablement classé à tort dans l'espèce des *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* est à l'origine d'infections cutanées opportunistes chez le chien (van Duijkeren et al., 2011) et peut causer des infections chez d'autres espèces y compris l'Homme (Weese and van Duijkeren, 2010). De plus, la transmission de *S. pseudintermedius* du chien à l'Homme a été mise en évidence (Laarhoven et al., 2011; Paul et al., 2011). Peu de connaissances sont disponibles sur les facteurs de pathogénicité de *S. pseudintermedius*, cependant le mécanisme de virulence de la bactérie est en certains points similaire au mécanisme de virulence des *S. aureus*, notamment en ce qui concerne les facteurs de virulence (van Duijkeren et al., 2011).

### **Épidémiologie**

L'émergence de *S. pseudintermedius* résistant à la méticilline (SPRM) est une problématique de santé publique actuelle (Laarhoven et al., 2011). Un laboratoire vétérinaire a rapporté une augmentation de 272% des SPRM entre 2007 et 2011 (Steen, 2011). Comme le *S. aureus* résistant à la méticilline, la résistance est portée par le gène *mecA* conférant à la bactérie une résistance à toutes les bêta-lactames et certains des autres groupes d'antibiotiques (van Duijkeren et al., 2011). Les souches SPRM, par rapport aux souches sensibles, semblent coloniser de manière plus efficace l'organisme humain (Paul et al., 2011).



Une étude récente a mis en évidence la présence de SPRM chez des rats surmulots (n=5/237). Les souches isolées étaient pour l'une commune à celles rapportées chez le chien alors que la seconde n'était pas décrite jusque-là (Himsworth et al., 2013b). Ces conclusions soulèvent les questions du rôle du rat dans le cycle d'infection par les SPRM, son enjeu dans le risque de transmission des SPRM à l'Homme et son rôle dans l'évolution du germe.

### **Diagnostic de laboratoire**

Dans une première étape, la difficulté du diagnostic repose sur l'identification de *S. pseudintermedius* parmi le groupe des *S. intermedius* (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius* et *S. delphini*). Des techniques telles que la PCR-RFLP, le typage du *spa*, la PCR multiplex ciblant le gène *nuc* et la « Multi Locus Sequence Typing » (MLST) ont été développées dans ce but. Une méthode plus rapide et prometteuse est la « matrix-assisted laser desorption ionization time of flight » (MALDI-TOF) par spectrométrie de masse (Murugaiyan. J, 2011).

La seconde étape permet de caractériser la résistance à la méticilline. L'antibiogramme peut être associé à des faux négatifs. La méthode la plus performante mais peu répandue est la mise en évidence du gène *mecA* par PCR. La mise en évidence de l'antigène 2a de la protéine fixatrice de la pénicilline par le test d'agglutination sur latex a été préalablement développée pour le SARM et peut être utilisée pour détecter les SPMR si combinée à d'autres tests. Enfin le typage de *SCCmec* peut être utilisé pour SPMR comme pour le SARM (van Duijkeren et al., 2011).

#### *1.1.8 Escherichia coli*

### **Agents**

D'un point de vue clinique, 5 groupes d'*Escherichia coli* se distinguent classiquement, *E. coli* entero-aggregative (EAEC), *E. coli* enterohémorragique (EHEC), *E. coli* enteropathogénique (EPEC), *E. coli* enteroinvasive (EIEC) and *E. coli* enterotoxigénique (ETEC) (Rasko et al., 2008). Le facteur de virulence principal, la toxine shiga-like (Stx), est produite par les souches EHEC. Ces souches sont aussi appelées *E. coli* productrices de Shiga toxine (STEC). La pathogénicité des souches repose de plus sur une série de facteurs de virulence tels que les adhésines et les invasines aussi nécessaires pour l'identification des souches.

### **Clinique**

Chez l'Homme, 70% des infections à *E. coli* sont asymptomatiques (Ludwig et al., 2002). Cependant, l'infection intestinale peut entraîner une bactériémie (Le Moine et al., 1987) et l'infection à EHEC est la première cause de diarrhée hémorragique dans les pays tempérés (Karch et al., 1999). Les diarrhées causées par *E. coli* sont responsables de plus de 2 millions de morts chaque année et représentent un

problème sanitaire mondial (Chen and Frankel, 2005). La gravité de ces infections intestinales réside dans leur capacité à causer des manifestations systémiques et épidémies étendues (Karch et al., 2005).

### **Épidémiologie**

Parmi les voies de transmission de *E. coli*, trois sont principalement décrites: l'ingestion de nourriture ou d'eau contaminée, le contact avec une personne infectée et le contact avec des fèces animales contaminées (Karch et al., 1999; Rounds et al., 2012). Différentes souches d'*E. coli* ont été isolées chez le rat surmulot (Burriel et al., 2008; Guenther et al., 2010; Nkogwe et al., 2011). Récemment, parmi un échantillonnage de rats dans la ville de New York, EPEC a été isolé dans les fèces de 38% (n=50/133) d'entre eux et était le pathogène zoonotique prédominant (Firth et al., 2014). D'après Nielsen et al., 2004, les souches détectées chez les animaux et les rats présents sur une même ferme étaient identiques suggérant la transmission potentielle d'*E. coli* d'une espèce à l'autre. Alors que les bovins seraient le principal réservoir de STEC, des souches identiques ont été isolées d'espèces de la faune sauvage suggérant leur potentielle implication dans le maintien de la souche (Nielsen et al., 2004). Les rats auraient donc un rôle dans le cycle épidémiologique de l'infection à EC pathogènes et représenteraient un enjeu de santé publique quant aux maladies associées chez l'Homme et les animaux domestiques.

### **Diagnostic de laboratoire**

La détection d'EHEC utilise des techniques moléculaires (PCR) ou sérologiques (ELISA) ciblant respectivement les gènes *stx* ou la protéine *stx* (Karch et al., 1999). Cependant, aucune ne permet de détecter toutes les souches d'*E. coli* pouvant être responsables de diarrhée. De nouvelles méthodes basées sur des cibles présentes dans les germes *stx+* et *stx-* seraient plus prometteuses en termes de diagnostic (Friedrich et al., 2007).

#### **1.1.9 Salmonella spp.**

### **Agent et impact sur la santé publique**

*Salmonella spp.* est une bactérie gram négatif agent de la salmonellose. Cette espèce bactérienne est divisée en plus de 2500 sérotypes basés sur 2 antigènes de membrane (CDC 2008). Seul un petit nombre de sérotypes est responsables de gastro entérites typhoïde-like chez l'Homme et l'animal. Les sérotypes *S. enterica* serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*) et *S. Typhimurium* ont une implication sanitaire majeure (EFSA 2010). Dans le monde, 200 millions de gastro entérite et 3 millions de morts associés aux salmonelles sont estimés (Coburn et al., 2007). Dans l'Union Européenne, plus de 100 000 cas humains sont signalés chaque année et la salmonellose est une des principales causes de gastro entérite (Skov et al., 2008).

## **Épidémiologie**

Les salmonelles ont un tropisme intestinal et sont excrétées dans l'environnement conduisant à la contamination du sol et de l'eau. La bactérie est ainsi maintenue dans un cycle impliquant l'environnement et le portage animal. L'homme s'infecte par la voie féco-orale à partir d'un environnement ou de nourriture contaminé (Levantesi et al., 2012). Bien que colonisant le tube digestif des animaux de production, ces derniers sont le plus souvent asymptomatiques et restent une source de contamination majeure des denrées alimentaires (Coburn et al., 2007). Le rat est capable de porter des charges importantes de salmonelles et de les excréter dans l'environnement (Nkogwe et al., 2011; Yokoyama et al., 2007). Une étude de prévalence menée à Yokohama (Japon) a détecté *salmonella spp* chez 18% à 21% des rats surmulots, *S. Typhimurium* était majoritairement isolé (Yokoyama et al., 2007). En pouvant contaminer l'eau et la nourriture des animaux de rentes et de l'Homme ou être directement ingérés par les suidés, les rats auraient un rôle dans le cycle des salmonelles et représentent donc un enjeu dans la lutte intégrée contre cette infection. Par ailleurs, une augmentation de la résistance des salmonelles aux antibiotiques communs serait la conséquence de l'utilisation de l'antibioprophylaxie chez les animaux de production (Nkogwe et al., 2011; Threlfall, 2002). Au contact des animaux de production, le rat pourrait être infecté et disséminer de telles souches.

## **Diagnostic de laboratoire**

Le test diagnostique de référence est la culture bactériologique à partir d'échantillon de fèces cependant la croissance lente (5 jours) limite l'utilisation de cette approche (Uyttendaele et al., 2003). En routine, le recours à la PCR, à la micro puce et l'amplification isotherme induite par boucle (Loop-mediated isotherm amplification) est commun. Ces méthodes ont une sensibilité et une spécificité similaire à la culture bactérienne (Li and Ruan, 2009). Cependant, la présence de la bactérie dans les fèces est de quelques jours, la détection directe a donc un intérêt limité par rapport à la sérologie qui met en évidence l'exposition à la bactérie. Des tests ELISA ont été développés et standardisés en médecine vétérinaire mais ne sont pas disponibles pour détecter les salmonelles non-typhoïdes chez l'homme. Toutefois, la sensibilité et la spécificité des tests sérologiques restent faibles (Kuhn et al., 2012).

### **1.1.10 *Campylobacter spp***

#### **Agent**

*Campylobacter spp.* est l'agent de la campylobactériose. Avec plus de 190 000 cas humains par an, cette maladie est la maladie d'origine alimentaire la plus fréquemment signalée dans l'Union

Européenne (Silva et al., 2011). Cependant, la maladie est largement sous diagnostiquée et sa prévalence réelle serait neuf millions chaque année (EFSA 2014).

### **Épidémiologie**

De nombreuses espèces animales (volailles, bovins, porcins, rongeurs) ont un portage intestinal asymptomatique de la bactérie pouvant être à l'origine d'une contamination des denrées alimentaires. Cependant, les connaissances sur l'écologie de la bactérie sont limitées par des voies de transmission complexes, le nombre élevé des sources possibles et la diversité génétique des souches (Acke et al., 2010; Devane et al., 2005). Le portage de *Campylobacter* spp par le rat surmulot et une prévalence de 3,4% à 4% a été rapportée (Firth et al., 2014; Nkogwe et al., 2011). Le rat pourrait être réservoir pour l'Homme et animaux de rentes en souillant l'eau et l'alimentation ou en étant directement ingéré par ces derniers (Meerburg et al., 2006; Newell and Fearnley, 2003).

### **Diagnostic de laboratoire**

La détection de *Campylocater* spp. se fait par culture, PCR en temps réel ou ELISA (anticorps anti immunoglobuline A et M). La culture peut prendre plus de 5 jours ce qui est lent dans le cadre du diagnostic (Wang et al., 2012). La sensibilité de la culture est de 65% par comparaison à une combinaison d'approches moléculaire (PCR conventionnelle et en temps réel) et sérologique (Bessède et al., 2011). Le test ELISA a une sensibilité de 82 à 96% (Ang et al., 2007).

#### *1.1.11 Yersinia enterocolitica et Y. pseudotuberculosis*

### **Agents**

*Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* sont des bactéries gram négatif agents de yersiniozes chez l'homme et dont la symptomatologie (douleur abdominale, diarrhée, fièvre) diffère fondamentalement de *Y. pestis*. La différence de virulence de *Y. pestis* par rapport à *Y. pseudotuberculosis* serait liée à 466 gènes délétés ou inactivés chez *Y. pestis* (Ahmed et al. 2008). La divergence génétique entre *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* est importante, liée à une séparation en deux espèces distinctes qui remonterait à plus d'un million d'années (Zhou and Yang, 2009).

### **Impact sur la santé publique**

Les yersiniozes, majoritairement les infections par *Y. enterocolitica*, sont une des zoonoses entériques les plus rapportées en Europe avec 6500 cas par ans (Backhans et al., 2011). Bien que les yersinioze à *Y. pseudotuberculosis* soient présentes dans le monde, elles ne font pas l'objet d'une veille particulière et sont donc sous estimées (Long et al., 2010). Les grandes tendances de l'incidence de ces infections sont peu connues toutefois, une séroprévalence élevée a été décrite en Finlande (31%) et en Allemagne (43%) (Fleige and Pfaffl, 2006; Mäki-Ikola et al., 1997).

## **Épidémiologie**

*Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* ont un large spectre d'hôtes y compris l'Homme (Rosner et al., 2010). L'hôte définitif de *Y. enterocolitica* semble être le porc (Bottone, 1997). Le rôle de réservoir *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* par les rongeurs, notamment les rongeurs circulant dans les porcheries, n'est pas clairement établi. Plutôt que réservoir ils pourraient être hôtes accidentels suite à la circulation de la bactérie parmi les suidés (Backhans et al., 2011; Laukkanen et al., 2008). Une étude récente rapporte les animaux domestiques et notamment le chien comme porteur et réservoir potentiel de *Y. enterocolitica* (Wojciechowska et al., 2010). Etant en contact avec ces espèces, il est probable que les rongeurs aient un rôle dans le cycle épidémiologique de *Y. enterocolitica*. En effet, les rongeurs ont été mis en cause dans certaines épidémies d'origine alimentaire (Williams and Barker, 2001).

## **Diagnostic de laboratoire**

L'isolement de *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* à partir de cas cliniques ou sur les denrées alimentaires peut être limité par la faible sensibilité de la culture (incubation longue, difficultés de différenciation des espèces pathogènes et non-pathogènes) (Fredriksson-Ahomaa et al., 2006). La méthode diagnostique la plus pertinente est la combinaison d'un tableau clinique évocateur de yersiniose et un test sérologique tel que l'ELISA (Rosner et al., 2010). La PCR est spécifique cependant la culture bactérienne reste nécessaire pour établir l'antibiogramme ou dans un but de génotypage (Riehm et al., 2011).

### *1.1.12 Clostridium difficile*

#### **Agent**

*Clostridium difficile* est une bactérie anaérobie et un pathogène d'importance pour la santé publique (Cartman et al., 2010; Keessen et al., 2011). Elle forme des spores virulentes qui persistent dans l'environnement favorisant leur transmission (Kuijper et al., 2007; Rupnik et al., 2009).

#### **Clinique**

Les manifestations cliniques d'infection à *Clostridium difficile* varient d'un portage asymptomatique à une colite engageant le pronostic vital (Keessen et al., 2011; Kuijper et al., 2007). La maladie est le résultat de la multiplication d'une souche produisant les toxines A (TcdA) et B (TcdB) et de la contribution d'une troisième toxine (CDT). *Clostridium difficile* est une bactérie opportuniste dont la multiplication dans l'intestin dépend de la flore présente dans le colon (Clements et al., 2010; Rupnik et al., 2009). La maladie est souvent la conséquence d'un traitement antibiotique qui, altérant la flore commensale, laisse libre cours à la multiplication de *C. difficile* (Clements et al., 2010; Rupnik et al.,

2009). L'infection est plus souvent acquise dans les hôpitaux et dans les lieux médicalisés où se trouvent des personnes âgées recevant une antibiothérapie.

### **Impact sur la santé publique**

Une augmentation de l'incidence et de la sévérité des infections a été notée ces dernières années (Clements et al., 2010). L'émergence d'une souche « hyper virulentes » et épidémiques serait à l'origine de cette augmentation, en particulier les souches 027 et 078 qui sont souvent les plus pathogènes, transmissibles et difficiles à traiter (Cartman et al., 2010; Clements et al., 2010; Keessen et al., 2011). Une augmentation des cas d'infection associés à la communauté (i.e. non associés au milieu hospitalier) est aussi rapportée (Cartman et al., 2010; Clements et al., 2010; Goorhuis et al., 2008; Keessen et al., 2011).

### **Épidémiologie**

Des infections par *C. difficile* associées à des manifestations cliniques ont été décrites chez différentes espèces animales (Keel and Songer, 2006; Keessen et al., 2011; Kuijper et al., 2007). Le plus souvent, les souches isolées chez les animaux sont similaires à celle isolées chez l'Homme (Cartman et al., 2010; Keessen et al., 2011; Kuijper et al., 2007) et suggèrent la possible transmission de l'animal à l'Homme que ce soit par contact direct ou indirect via la contamination des denrées alimentaires ou de l'environnement (Clements et al., 2010; Keessen et al., 2011). Chez des rats de Vancouver et de la ville de New York, *Clostridium difficile* a été isolé chez 95 (n=724) et 1 (n=133) rats, respectivement. Dans le premier échantillonnage, 9 souches étaient du ribotype 027 ou 078 suggérant le potentiel rôle du rat dans le cycle de transmission de la bactérie (Himsworth et al., 2014b).

### **Diagnostic de laboratoire**

Le test de cytotoxicité est considéré comme la méthode de référence, il consiste à mettre en évidence l'effet cytotoxique de la toxine B d'un filtrat de selles déposé sur une culture cellulaire. Cette méthode est sensible mais nécessite une infrastructure de laboratoire adaptée à la culture cellulaire et les résultats sont obtenus après 24 - 48h. Une alternative, plus rapide et plus accessible est la méthode basée sur la PCR en temps réel qui détecte le gène *tcdB*. Le gène *tcdB* est retrouvé dans toutes les souches pathogènes de *C. difficile*. Cette méthode est rapide (2 heures), sensible (93.8%) et spécifique (99.1%).

## 1.2 Les agents des zoonoses virales

### 1.2.1 Hantavirus Séoul

#### **État des lieux**

Les hantaviroses sont des zoonoses virales dues aux Hantavirus (famille des Bunyaviridae) dont les manifestations cliniques, potentiellement fatales, concernent en moyenne 200 000 patients par année, dans le monde. Désormais, plus de 40 Hantavirus sont identifiés, parmi lesquels le virus Séoul (SEOV) associé à la découverte récente de souches pathogènes en Europe (la forme la plus fréquente d'hantavirose en France est due au virus Puumala dont le réservoir est le campagnol). Les rats, dont le rat surmulot, sont les réservoirs de SEOV. L'épidémiologie et la pathologie associées au virus SEOV ont été synthétisées (Ayrat, 2013b).

#### **Diagnostic de laboratoire**

Les méthodes de détection des Hantavirus sont basées sur la sérologie et l'immunologie (Kramski et al., 2007). Le test standard permettant de différencier les espèces d'Hantavirus est le « focus reaction neutralisation test » (Mertens et al., 2011), cependant le délai de réalisation du test (11 jours) est une limite pour son utilisation en routine (Handke et al., 2010). Les tests ELISA et « focus reaction neutralization test » ont une sensibilité et une spécificité de 99%. Une méthode PCR par transcriptase inverse est disponible et particulièrement intéressante pour déterminer la charge et la durée de la virémie.

### 1.2.2 Virus de l'Hépatite E

#### **Agent**

Le virus de l'Hépatite E du genre Hepevirus, famille des Hepeviridae, est un virus à ARN non enveloppé (Reuter et al., 2006). Il a été récemment classé parmi les zoonoses virales (Meng, 2011) et cause des hépatites aiguës chez l'Homme (Hyams, 2002). Deux espèces de VHE se distinguent, l'une infectant les oiseaux et l'autre infectant les mammifères. Cette dernière se subdivise classiquement en 4 génotypes pouvant infecter l'Homme (Aggarwal and Naik, 2009). En Allemagne, une étude suggère l'existence d'un cinquième génotype décrit chez le rat (Johne et al., 2010). Enfin, une dernière étude ayant caractérisé le génome d'un VHE associé au rat au Vietnam statue sur une souche différente de la précédente (Li et al., 2013a).

#### **Épidémiologie**

Bien que le porc soit décrit comme le réservoir principal (Meng, 2011), les dernières découvertes ouvrent la question du rat comme potentiel réservoir de VHE. Le portage de VHE par le rat semble

répandu, en attestent les nombreuses études sur différents continents (Favorov et al., 2000; Johne et al., 2010; Li et al., 2013b; Purcell et al., 2011). Cependant, les souches caractérisées chez le rat ne semblent pas transmissibles aux primates non humains et inversement, celles de l'Homme ne semblent pas transmissibles au rat (Purcell et al., 2011). Dernièrement, une étude isolant une souche zoonotique chez le rat (Lack et al., 2012) et une autre mettant en évidence la propagation du virus associé au rat dans certaines lignées cellulaires soulèvent à nouveau la question de la place du rat en tant que réservoir du virus de l'Hépatite E pour l'Homme et le porc (Jirintai et al., 2014).

### **Diagnostic de laboratoire**

Le diagnostic de l'infection est communément déterminé par la détection d'anticorps anti VHE (Reuter et al., 2009). Cependant, cette approche serait plus sensible pour détecter les infections en phase clinique, ce qui pose une limite au dépistage de l'infection par cette méthode et notamment en zone endémique (Myint et al., 2006). L'ARN viral peut être détecté par PCR quantitative dans le sang et dans les fèces avec une bonne sensibilité et une bonne spécificité (Cooper et al., 2005). L'ARN viral peut être détecté jusqu'à 3 mois après le début de l'infection vs 30 jours dans le sang, par conséquent la PCR à partir de fèces est une alternative intéressante pour la détection de VHE (Bihl and Negro, 2010).

#### **1.2.4 Virus Cowpox**

### **Agent et impact sur la santé publique**

Le virus cowpox (VCPX), du genre Orthopoxvirus dans la famille des Poxviridae est un virus à ADN présent en Eurasie. Le VCPX est biologiquement proche du virus de la variole (virus Smallpox) et du virus de la vaccine ayant servi pour immuniser l'Homme. La vaccination massive de l'Homme contre la variole est à l'origine de la circulation de la souche vaccinale, de son évolution et de son échappement vers d'autres populations (da Fonseca et al., 2002), notamment des populations de rongeurs (Fonseca et al., 1998). Après l'éradication de la variole en 1980, la vaccination a été suspendue. L'immunité de la population contre les orthopoxvirus y compris VCPX diminue depuis lors et pourrait favoriser les infections chez les jeunes générations (Vestey et al., 1991).

### **Épidémiologie**

La virose à Cowpox virus est une zoonose rare, transmise par un contact étroit avec des animaux porteurs. Les lésions de VCPX sont des papules évoluant vers un nodule ulcératif. L'ulcère guérit avec la formation d'une cicatrice indélébile. Bien que les rongeurs soient le réservoir du virus (Chantrey et al., 1999), les chats, les vaches, les animaux de zoo ont également été rapportés comme sources de



VCPX pour l'Homme (Baxby et al., 1994; Vestey et al., 1991; Wolfs et al., 2002). Ces derniers auraient été contaminés par des rongeurs, devenant ainsi des vecteurs de la maladie (Kurth et al., 2008). Des études de séroprévalence ont mis en évidence l'infection endémique des rongeurs par le VCPX notamment chez les campagnols (*Myodes glareolus*), les souris sylvestres (*Apodemus sylvaticus*) et le campagnol agreste (*Microtus agretis*). Bien que les infections humaines issues du rat domestiqué soient décrites (Ducournau et al., 2013; Kurth et al., 2008; Ninove et al., 2009; Vogel et al., 2012), la prévalence chez les rats sauvages n'est pas rapportée.

### **Diagnostic de laboratoire**

La détection des VCPX peut se faire par sérologie ou par PCR. En particulier, la PCR permet de différencier les VCPX des autres Orthopoxvirus. Le matériel de choix est le contenu des lésions dans la phase aigüe de la maladie (Becker et al., 2009). La PCR quantitative étant sensible et rapide est la méthode la plus utilisée pour le diagnostic (Jirintai et al., 2014). Chez les espèces de la faune sauvage, le dépistage des infections à Orthopoxvirus se base sur la sérologie et ne permet pas la différenciation d'espèce (Pahlitzsch et al., 2006).

## **1.3 Les agents des zoonoses parasitaires**

### **1.3.1 *Angiostrongilus cantonensis***

#### **Agent et voie de transmission**

*Angiostrongilus cantonensis* est un nématode dont la forme adulte se développe dans les artères pulmonaires du rat (Wang et al., 2008, 2012). Les rats (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*) sont les principaux réservoirs de ce parasite. Les œufs sont excrétés dans les fèces et se développent chez différentes espèces de mollusques d'eau douce, hôtes intermédiaires (Wang et al., 2008). L'Homme s'infecte en consommant certains hôtes paraténiques (i.e. facultatifs, hébergent les formes larvaires sans leur développement, favorisent la dispersion et permettent l'accumulation du parasite) tels que des amphibiens ou des crustacés, dont la consommation est essentiellement attachée à certaines cultures. Une fois ingérée, la larve migre vers le système nerveux central ou l'œil et cause une angiostrongylose éosinophilique méningée ou oculaire (Wang et al., 2008, 2012).

#### **Épidémiologie**

Ce parasite est principalement présent en Asie, dans le pacifique sud, en Australie et dans les Caraïbes. Cependant des foyers endémiques sont décrits dans les continents africain et américain et certains cas sporadiques sont rapportés dans d'autres zones (Simoes et al., 2011; Wang et al., 2008, 2012).

### 1.3.2 *Toxoplasma gondii*

#### **Agent et cycle de transmission**

*Toxoplasma gondii* est un parasite unicellulaire qui peut infecter les oiseaux et les mammifères y compris l'Homme. Il constitue une zoonose alimentaire importante. *T. gondii* est le parasite le plus répandu chez l'Homme, 10% à 90% de la population mondiale aurait des anticorps dirigés contre le parasite, témoin d'une exposition antérieure (Pappas et al., 2009). Seule espèce du genre *Toxoplasma*, *T. gondii* compte plus de 200 souches réparties en 3 types selon leur virulence.

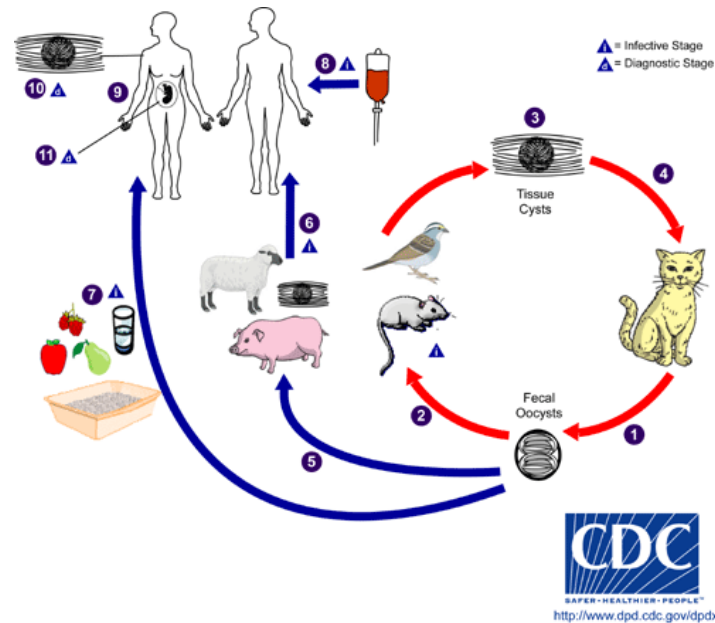
La Figure 4a décrit le cycle de transmission de *T. gondii* et représente la place du rat. Les félinés sont les seuls hôtes définitifs décrits (1) qui disséminent les oocystes infestants dans l'environnement contaminant ainsi la faune sauvage dont le rat (2). La séroprévalence chez le rat varie de 1% à 35% selon les études (Dubey et al., 2006; Mosallanejad et al., 2012; Webster, 1994; Yin et al., 2010). Une étude récente en France rapporte une prévalence de 12.5% (Gotteland et al., 2014). Chez les rats infestés, le parasite se localise dans les muscles striés (3), formant un kyste bradizoïte. Le rat devient alors une source d'infection pour le chat, prédateur (4). Une étude a mis en évidence la perte de l'aversion à l'urine de chat chez les rats infectés par *T. gondii* (Webster, 2001). Ce changement de comportement augmente la susceptibilité du rat à la prédation du chat et favorise l'infestation du chat par les toxoplasmes issus du rat. Par ailleurs, Webster, 1994 rapporte qu'une population de rat sans contact avec des chats pourrait assurer la persistance du parasite, leur conférant un rôle de réservoir pour le chat. L'environnement contaminé est une source d'infestation pour les animaux de rente (5), à leur tour source pour l'homme lorsque la viande est consommée insuffisamment cuite (6). L'Homme peut de plus s'infester par contact direct avec le chat ou par ingestion de nourriture ou d'eau contaminée par des fèces de chat infesté, seul hôte définitif du parasite (Montoya and Liesenfeld, 2004) (7) ou par transfusion (8). Bien que les rats ne soient pas une source directe d'infestation pour l'Homme, ils sont hôtes intermédiaires de *T. gondii* et sont une source pour leur prédateur ou lorsque ingérés accidentellement par les animaux de rentes (Klun et al., 2011; Webster, 1994). Ces derniers étant des sources parasitaires pour l'Homme, le rat reste une cible dans la lutte intégrée contre la toxoplasmose.

#### **Clinique**

La figure 4b décrit les conséquences de l'infestation chez l'Homme (9). L'infestation est le plus souvent subclinique, néanmoins des lymphadénopathies cervicales et des maladies oculaires sont rapportés chez certains patients (10). Lorsqu'acquise durant la grossesse (Toxoplasmose congénitale), l'infestation par les toxoplasmes peut entraîner la mort du fœtus ou des syndromes tels que des déficits neurologiques et des chorioretinites (11). Chez les patients immunodéficients, une réactivation des formes latentes peut être observée avec des encéphalites engageant le pronostic vital.

## Épidémiologie

L'incidence annuelle globale de la toxoplasmose congénitale a été estimée à 190 000 cas et représente une charge de morbidité considérable au niveau mondial (Torgerson and Mastroiacovo, 2013).



**Figure 20 – Cycle de transmission de *T. gondii* (a)**

et conséquences de l'infestation chez l'Homme (b).

<http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>, consulté le 02/12/2014

## Diagnostic de laboratoire

Chez l'Homme, la détection de l'exposition au parasite se fait essentiellement par sérologie (Sabin Feldman Dye Test et immunofluorescence). La détection directe des toxoplasmes peut se faire par PCR cependant le nombre de protozoaires peut être faible et leurs distribution tissulaire localisée, potentiellement responsable de résultats faussement négatifs (Howe et al., 1997). Le test de référence est l'inoculation sur souris qui permet de plus d'évaluer le degré de virulence du parasite. Pour les mêmes raisons, le résultat du test peut être faussement négatif.

### 1.3.3 *Trichinella spiralis*

## Agent et réservoirs

*Trichinella spiralis* est un nématode parasite de nombreux mammifères y compris l'Homme. Les hôtes principaux sont les suidés, cependant le rat peut intervenir comme hôte intermédiaire (Gottstein et al., 2009; Murrell et al., 2000).

## Clinique

La trichine est un parasite à tropisme digestif et musculaire, entraînant chez l'homme de la fièvre, des douleurs abdominales, des diarrhées et des vomissements (Bruschi et *al.* 2002). L'infestation de l'Homme se fait principalement par ingestion de viande de porc contaminée crue ou insuffisamment cuite. Plus généralement l'ingestion de muscles striés infestés est la seule voie de transmission du parasite (Pozio et *al.* 2009). Les rats pourraient être une source parasitaire dans les élevages de porc lors d'ingestion accidentelle, entraînant leur contamination bande après bande (Pozio et *al.* 2009), toutefois cette voie de transmission reste controversée (Franssen et *al.* 2011).

### **Épidémiologie**

En Europe, les cas de trichinose rapportés ont augmenté de 12% de 2008 à 2009 (748 cas confirmés). Cette augmentation est principalement liée à une augmentation des cas en Europe de l'est (EFSA 2011). Un règlement européen (EC) No 2075/2005 stipule l'obligation de tester toutes les espèces susceptibles aux trichines, principalement les porcs, les chevaux et les sangliers. Ainsi, les données de surveillance chez les animaux viennent essentiellement des analyses faites dans le contexte de l'abattage. En Europe de l'ouest, la prévalence (2007-2009) était de 0.0004% (EFSA 2011) et remet en question la pertinence du programme de surveillance en place. Une approche basée sur le risque serait économiquement et épidémiologiquement plus pertinente. Le rat étant potentiellement sentinelle pour les trichines, il pourrait être une espèce d'intérêt dans une approche intégrative de la surveillance des élevages. Chez le rat, la prévalence de l'infestation en Asie a été rapportée à 2.8% (Thi et *al.* 2014), elle est peu décrite par ailleurs.

### **Diagnostic de laboratoire**

Le diagnostic de la trichinose chez l'Homme se fait principalement par sérologie, ELISA (anti corps anti Immunoglobuline G) cependant les résultats faux positifs sont fréquents. Un western blot a été développé pour la confirmation de résultat sérologique positif, la combinaison de ces deux tests est associée à une bonne sensibilité et une bonne spécificité (Gomez-Morales et *al.* 2012). Les méthodes de séquençage (PCR en temps réel, LAMP) sont disponibles chez le porc et permettent d'identifier l'espèce infestante, cependant leur utilisation est limitée par leur coût (Pozio et *al.* 2003; Li et *al.* 2013). En épidémiologie vétérinaire, la sérologie est l'approche de choix pour sa rapidité et son intérêt économique (Gamble et *al.* 2004).

#### **1.3.4 *Hymenolepis* spp., *Rodentolepis* spp., *capillaria hepatica*, *Cryptosporidium* spp.**

Les rats sont les réservoirs de *Hymenolepis* spp. et *Rodentolepis* spp., cestodes zoonotiques à tropisme intestinal (Easterbrook et *al.* 2007; Milazzo et *al.* 2010; Hancke et *al.* 2011). Les stades larvaires peuvent être transmis par voie féco-orale de rat à rat, du rat à l'homme et dans une moindre mesure une transmission inter humaine peut avoir lieu. La consommation d'arthropodes intermédiaires

infectés peut aussi être une source d'infection (CDCP 2012b). Chez l'Homme l'infection est le plus souvent asymptomatique toutefois des hépatites associées sont rapportées (CDCP 2012b).

Les rats ont été investigués comme potentiel réservoir de *Cryptosporidium spp*, parasites à tropisme intestinal chez l'Homme (Kimura et al. 2007).

## RÉFÉRENCES

- Acke, E., McGill, K., Lawlor, A., Jones, B.R., Fanning, S., and Whyte, P. (2010). Genetic diversity among *Campylobacter jejuni* isolates from pets in Ireland. *Vet. Rec.* *166*, 102–106.
- Adler, B., and de la Peña Moctezuma, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* *140*, 287–296.
- Aggarwal, R., and Naik, S. (2009). Epidemiology of hepatitis E: current status. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *24*, 1484–1493.
- Albedwawi, S., LeBlanc, C., Shaw, A., Show, A., and Slinger, R.W. (2006). A teenager with fever, rash and arthritis. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* *175*, 354.
- Ang, C.W., Krogfelt, K., Herbrink, P., Keijser, J., van Pelt, W., Dalby, T., Kuijf, M., Jacobs, B.C., Bergman, M.P., Schiellerup, P., et al. (2007). Validation of an ELISA for the diagnosis of recent *Campylobacter* infections in Guillain-Barré and reactive arthritis patients. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *13*, 915–922.
- Angelakis, E., Mediannikov, O., Socolovschi, C., Mouffok, N., Bassene, H., Tall, A., Niangaly, H., Doumbo, O., Znazen, A., Sarih, M., et al. (2014). *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* *28*, 107–110.
- Ayral, F. (2013). La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France : impact économique de la maladie. *Bulletin des GTV*.
- Azad, A.F., Radulovic, S., Higgins, J.A., Noden, B.H., and Troyer, J.M. (1997). Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg. Infect. Dis.* *3*, 319–327.
- Backhans, A., Fellström, C., and Lambertz, S.T. (2011). Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in small wild rodents. *Epidemiol. Infect.* *139*, 1230–1238.
- Balleydier, E., Camuset, G., Socolovschi, C., Moiton, M.-P., Kuli, B., Foucher, A., Poubeau, P., Borgherini, G., Wartel, G., Audin, H., et al. (2015). Murine Typhus, Reunion, France, 2011–2013. *Emerg. Infect. Dis.* *21*, 316–319.
- Baxby, D., Bennett, M., and Getty, B. (1994). Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases. *Br. J. Dermatol.* *131*, 598–607.
- Becker, C., Kurth, A., Hessler, F., Kramp, H., Gokel, M., Hoffmann, R., Kuczka, A., and Nitsche, A. (2009). Cowpox virus infection in pet rat owners: not always immediately recognized. *Dtsch. Ärztebl. Int.* *106*, 329–334.

- Bessède, E., Delcamp, A., Sifré, E., Buissonnière, A., and Mégraud, F. (2011). New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 941–944.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., et al. (2003). Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* *3*, 757–771.
- Bihl, F., and Negro, F. (2010). Hepatitis E virus: a zoonosis adapting to humans. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 817–821.
- Billeter, S.A., Gundi, V.A.K.B., Rood, M.P., and Kosoy, M.Y. (2011). Molecular detection and identification of *Bartonella* species in *Xenopsylla cheopis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae) collected from *Rattus norvegicus* rats in Los Angeles, California. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 7850–7852.
- Bishara, J., Amitay, E., Barnea, A., Yitzhaki, S., and Pitlik, S. (2002). Epidemiological and Clinical Features of Leptospirosis in Israel. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *21*, 50–52.
- Blanton, L.S., Vohra, R.F., Bouyer, D.H., and Walker, D.H. (2015). Reemergence of Murine Typhus in Galveston, Texas, USA, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* *21*, 484–486.
- Boisier, P., Rasolomaharo, M., Ranaivoson, G., Rasoamanana, B., Rakoto, L., Andrianirina, Z., Andriamahefazafy, B., and Chanteau, S. (1997). Urban epidemic of bubonic plague in Majunga, Madagascar: epidemiological aspects. *Trop. Med. Int. Health* *2*, 422–427.
- Boot, R., Oosterhuis, A., and Thuis, H.C.W. (2002). PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. *Lab. Anim.* *36*, 200–208.
- Bottone, E.J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* *10*, 257–276.
- Boulouis, H.-J., Chang, C.-C., Henn, J.B., Kasten, R.W., and Chomel, B.B. (2005). Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet. Res.* *36*, 383–410.
- Breitschwerdt, E.B., and Kordick, D.L. (2000). *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* *13*, 428–438.
- Brod, C.S., Aleixo, J.A.G., Jougla, S.D.D., Fernandes, C.P.H., Teixeira, J.L.R., and Dellagostin, O.A. (2005). [Evidence of dog as a reservoir for human leptospirosis: a serovar isolation, molecular characterization and its use in a serological survey]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* *38*, 294–300.
- Brouqui, P., Lascola, B., Roux, V., and Raoult, D. (1999). Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients. *N. Engl. J. Med.* *340*, 184–189.
- Burriel, A.R., Kritas, S.K., and Kontos, V. (2008). Some microbiological aspects of rats captured alive at the port city of Piraeus, Greece. *Int. J. Environ. Health Res.* *18*, 159–164.
- Cartman, S.T., Heap, J.T., Kuehne, S.A., Cockayne, A., and Minton, N.P. (2010). The emergence of “hypervirulence” in *Clostridium difficile*. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* *300*, 387–395.
- Chanteau, S., Ratsifasoamanana, L., Rasoamanana, B., Rahalison, L., Randriambeloso, J., Roux, J., and Rabeson, D. (1998). Plague, a reemerging disease in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* *4*, 101–104.
- Chanteau, S., Ratsitorahina, M., Rahalison, L., Rasoamanana, B., Chan, F., Boisier, P., Rabeson, D., and Roux, J. (2000). Current epidemiology of human plague in Madagascar. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *2*, 25–31.

- Chanteau, S., Rahalison, L., Ralafiarisoa, L., Foulon, J., Ratsitorahina, M., Ratsifasoamanana, L., Carniel, E., and Nato, F. (2003). Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet* 361, 211–216.
- Chantrey, J., Meyer, H., Baxby, D., Begon, M., Bown, K.J., Hazel, S.M., Jones, T., Montgomery, W.I., and Bennett, M. (1999). Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol. Infect.* 122, 455–460.
- Chen, H.D., and Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 83–98.
- Chen, P.-L., Lee, N.-Y., Yan, J.-J., Yang, Y.-J., Chen, H.-M., Chang, C.-M., Lee, H.-C., Ko, N.-Y., Lai, C.-H., and Ko, W.-C. (2007). Prosthetic valve endocarditis caused by *Streptobacillus moniliformis*: a case of rat bite fever. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3125–3126.
- Chomel, B.B. (2004). *Bartonellaceae in Veterinary Microbiology* (Ames, IA, USA).
- Cimolai, N. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada: a historical perspective and lessons learned. *Can. J. Microbiol.* 56, 89–120.
- Civen, R., and Ngo, V. (2008). Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 46, 913–918.
- Clements, A.C.A., Magalhães, R.J.S., Tatem, A.J., Paterson, D.L., and Riley, T.V. (2010). *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. *Lancet Infect. Dis.* 10, 395–404.
- Coburn, B., Grassl, G.A., and Finlay, B.B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* 85, 112–118.
- Cooper, K., Huang, F.F., Batista, L., Rayo, C.D., Bezanilla, J.C., Toth, T.E., and Meng, X.J. (2005). Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1684–1688.
- Devane, M.L., Nicol, C., Ball, A., Klena, J.D., Scholes, P., Hudson, J.A., Baker, M.G., Gilpin, B.J., Garrett, N., and Savill, M.G. (2005). The occurrence of *Campylobacter* subtypes in environmental reservoirs and potential transmission routes. *J. Appl. Microbiol.* 98, 980–990.
- Dreyfus, A., Benschop, J., Collins-Emerson, J., Wilson, P., Baker, M.G., and Heuer, C. (2014). Sero-prevalence and risk factors for leptospirosis in abattoir workers in New Zealand. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 11, 1756–1775.
- Dubey, J.P., Bhaiyat, M.I., Macpherson, C.N.L., de Allie, C., Chikweto, A., Kwok, O.C.H., and Sharma, R.N. (2006). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in rats (*Rattus norvegicus*) in Grenada, West Indies. *J. Parasitol.* 92, 1107–1108.
- Ducournau, C., Ferrier-Rembert, A., Ferraris, O., Joffre, A., Favier, A.-L., Flusin, O., Van Cauteren, D., Kecir, K., Auburtin, B., Védy, S., et al. (2013). Concomitant human infections with 2 cowpox virus strains in related cases, France, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1996–1999.
- Van Duijkeren, E., Box, A.T.A., Heck, M.E.O.C., Wannet, W.J.B., and Fluit, A.C. (2004). Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. *Vet. Microbiol.* 103, 91–97.

- Van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M.A., Pomba, M.C., Pyörälä, S., Ruzauskas, M., Sanders, P., Threlfall, E.J., Torren-Edo, J., et al. (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2705–2714.
- Elliott, S.P. (2007). Rat bite fever and *Streptobacillus moniliformis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 13–22.
- Ellis, B.A., Regnery, R.L., Beati, L., Bacellar, F., Rood, M., Glass, G.G., Marston, E., Ksiazek, T.G., Jones, D., and Childs, J.E. (1999). Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: an Old World origin for a New World disease? *J. Infect. Dis.* 180, 220–224.
- Evangelista, K.V., and Coburn, J. (2010). *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 5, 1413–1425.
- Favorov, M.O., Kosoy, M.Y., Tsarev, S.A., Childs, J.E., and Margolis, H.S. (2000). Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J. Infect. Dis.* 181, 449–455.
- Firth, C., Bhat, M., Firth, M.A., Williams, S.H., Frye, M.J., Simmonds, P., Conte, J.M., Ng, J., Garcia, J., Bhuva, N.P., et al. (2014). Detection of Zoonotic Pathogens and Characterization of Novel Viruses Carried by Commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio* 5, e01933–14.
- Fleige, S., and Pfaffl, M.W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* 27, 126–139.
- Fonseca, F.G., Lanna, M.C., Campos, M.A., Kitajima, E.W., Peres, J.N., Golgher, R.R., Ferreira, P.C., and Kroon, E.G. (1998). Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch. Virol.* 143, 1171–1186.
- Da Fonseca, F.G., Trindade, G.S., Silva, R.L.A., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., and Kroon, E.G. (2002). Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J. Gen. Virol.* 83, 223–228.
- Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., and Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 315–329.
- Friedrich, A.W., Zhang, W., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Köck, R., Fruth, A., Tschäpe, H., and Karch, H. (2007). Prevalence, Virulence Profiles, and Clinical Significance of Shiga Toxin–Negative Variants of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Infection in Humans. *Clin. Infect. Dis.* 45, 39–45.
- Gaastra, W., Boot, R., Ho, H.T.K., and Lipman, L.J.A. (2009). Rat bite fever. *Vet. Microbiol.* 133, 211–228.
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S.B., Harmanus, C., Notermans, D.W., Bergwerff, A.A., Dekker, F.W., and Kuijper, E.J. (2008). Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 47, 1162–1170.
- Gotteland, C., Chaval, Y., Villena, I., Galan, M., Geers, R., Aubert, D., Poulle, M.-L., Charbonnel, N., and Gilot-Fromont, E. (2014). Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology* 141, 259–268.
- Gottstein, B., Pozio, E., and Nöckler, K. (2009). Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 127–145, Table of Contents.



- Graveland, H., Duim, B., van Duijkeren, E., Heederik, D., and Wagenaar, J.A. (2011). Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 301, 630–634.
- Graves, M.H., and Janda, J.M. (2001). Rat-bite fever (*Streptobacillus moniliformis*): a potential emerging disease. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 5, 151–155.
- Gray, E., Atatoa-Carr, P., Bell, A., Roberts, S., Al Mudallal, D., and Mills, G.D. (2007). Murine typhus: a newly recognised problem in the Waikato region of New Zealand. *N. Z. Med. J.* 120, U2661.
- Greenlee, J.J., Bolin, C.A., Alt, D.P., Cheville, N.F., and Andreasen, C.B. (2004). Clinical and pathologic comparison of acute leptospirosis in dogs caused by two strains of *Leptospira kirschneri* serovar grippotyphosa. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1100–1107.
- Guenther, S., Grobbel, M., Beutlich, J., Guerra, B., Ulrich, R.G., Wieler, L.H., and Ewers, C. (2010). Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 582–584.
- Guerra, M.A. (2009). Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 472–478, 430.
- Handke, W., Oelschlegel, R., Franke, R., Wiedemann, L., Krüger, D.H., and Rang, A. (2010). Generation and characterization of genetic reassortants between Puumala and Prospect Hill hantavirus in vitro. *J. Gen. Virol.* 91, 2351–2359.
- Himsworth, C.G., Patrick, D.M., Parsons, K., Feng, A., and Weese, J.S. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in rats. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 169–170.
- Himsworth, C.G., Miller, R.R., Montoya, V., Hoang, L., Romney, M.G., Al-Rawahi, G.N., Kerr, T., Jardine, C.M., Patrick, D.M., Tang, P., et al. (2014a). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*). *PloS One* 9, e87983.
- Himsworth, C.G., Patrick, D.M., Mak, S., Jardine, C.M., Tang, P., and Weese, J.S. (2014b). Carriage of *Clostridium difficile* by wild urban Norway rats (*Rattus norvegicus*) and black rats (*Rattus rattus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1299–1305.
- Holmberg, M., McGill, S., Ehrenborg, C., Wesslén, L., Hjelm, E., Darelid, J., Blad, L., Engstrand, L., Regnery, R., and Friman, G. (1999). Evaluation of human seroreactivity to *Bartonella* species in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1381–1384.
- Houpikian P., Maurin M., and Raoult D. Infections à *Bartonella*, *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Maladies infectieuses* (Elsiever).
- Howe, D.K., Honoré, S., Derouin, F., and Sibley, L.D. (1997). Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1411–1414.
- Hyams, K.C. (2002). New perspectives on hepatitis E. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 4, 302–307.
- Inoue, K., Maruyama, S., Kabeya, H., Yamada, N., Ohashi, N., Sato, Y., Yukawa, M., Masuzawa, T., Kawamori, F., Kadosaka, T., et al. (2008). Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species isolated from wild rodents in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5086–5092.
- Jansen, A., Schöneberg, I., Frank, C., Alpers, K., Schneider, T., and Stark, K. (2005). Leptospirosis in Germany, 1962–2003. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1048–1054.

- Jirintai, S., Tanggis, null, Mulyanto, null, Suparyatmo, J.B., Takahashi, M., Kobayashi, T., Nagashima, S., Nishizawa, T., and Okamoto, H. (2014). Rat hepatitis E virus derived from wild rats (*Rattus rattus*) propagates efficiently in human hepatoma cell lines. *Virus Res.* 185, 92–102.
- Johne, R., Heckel, G., Plenge-Bönig, A., Kindler, E., Maresch, C., Reetz, J., Schielke, A., and Ulrich, R.G. (2010). Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1452–1455.
- Just, F.T., Gilles, J., Pradel, I., Pfalzer, S., Lengauer, H., Hellmann, K., and Pfister, K. (2008). Molecular evidence for *Bartonella* spp. in cat and dog fleas from Germany and France. *Zoonoses Public Health* 55, 514–520.
- Karch, H., Bielaszewska, M., Bitzan, M., and Schmidt, H. (1999). Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 229–243.
- Karch, H., Tarr, P.I., and Bielaszewska, M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 295, 405–418.
- Keel, M.K., and Songer, J.G. (2006). The comparative pathology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Vet. Pathol.* 43, 225–240.
- Keeling, M.J., and Gilligan, C.A. (2000). Bubonic plague: a metapopulation model of a zoonosis. *Proc. Biol. Sci.* 267, 2219–2230.
- Keessen, E.C., Gaastra, W., and Lipman, L.J.A. (2011). *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Vet. Microbiol.* 153, 205–217.
- Khatchadourian, K., Ovetchkine, P., Minodier, P., Lamarre, V., Lebel, M.H., and Tapiéro, B. (2010). The rise of the rats: A growing paediatric issue. *Paediatr. Child Health* 15, 131–134.
- Kimura, M., Tanikawa, T., Suzuki, M., Koizumi, N., Kamiyama, T., Imaoka, K., and Yamada, A. (2008). Detection of *Streptobacillus* spp. in feral rats by specific polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 52, 9–15.
- Klun, I., Vujanić, M., Yera, H., Nikolić, A., Ivočić, V., Bobić, B., Bradonjić, S., Dupouy-Camet, J., and Djurković--Djaković, O. (2011). *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. *Vet. Res.* 42, 17.
- Kluytmans, J. (2007). Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the value of rapid tests. *J. Hosp. Infect.* 65 Suppl 2, 100–104.
- Kmety, E., and Dikken H (1993). Classification of the species *LEPTOSPIRA INTERROGANS* and history of its serovars. (The Netherlands: University Press Groningen).
- Ko, A.I., Galvão Reis, M., Ribeiro Dourado, C.M., Johnson, W.D., and Riley, L.W. (1999). Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* 354, 820–825.
- Ko, A.I., Goarant, C., and Picardeau, M. (2009). *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 736–747.
- Kordick, D.L., Hilyard, E.J., Hadfield, T.L., Wilson, K.H., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., and Breitschwerdt, E.B. (1997). *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J. Clin. Microbiol.* 35, 1813–1818.

- Kramski, M., Meisel, H., Klempa, B., Krüger, D.H., Pauli, G., and Nitsche, A. (2007). Detection and typing of human pathogenic hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing. *Clin. Chem.* *53*, 1899–1905.
- Kuhn, K.G., Falkenhorst, G., Ceper, T.H., Dalby, T., Ethelberg, S., Mølbak, K., and Krogfelt, K.A. (2012). Detecting non-typhoid *Salmonella* in humans by ELISAs: a literature review. *J. Med. Microbiol.* *61*, 1–7.
- Kuijper, E.J., van Dissel, J.T., and Wilcox, M.H. (2007). *Clostridium difficile*: changing epidemiology and new treatment options. *Curr. Opin. Infect. Dis.* *20*, 376–383.
- Kurth, A., Wibbelt, G., Gerber, H.-P., Petschaelis, A., Pauli, G., and Nitsche, A. (2008). Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus. *Emerg. Infect. Dis.* *14*, 670–671.
- Laarhoven, L.M., de Heus, P., van Luijn, J., Duim, B., Wagenaar, J.A., and van Duijkeren, E. (2011). Longitudinal study on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in households. *PloS One* *6*, e27788.
- Lack, J.B., Volk, K., and Van Den Bussche, R.A. (2012). Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerg. Infect. Dis.* *18*, 1268–1273.
- Laudisoit, A., Falay, D., Amundala, N., Akaibe, D., de Bellocq, J.G., Van Houtte, N., Breno, M., Verheyen, E., Wilschut, L., Parola, P., et al. (2014). High prevalence of *Rickettsia typhi* and *Bartonella* species in rats and fleas, Kisangani, Democratic Republic of the Congo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *90*, 463–468.
- Laukkanen, R., Martínez, P.O., Siekkinen, K.-M., Ranta, J., Maijala, R., and Korkeala, H. (2008). Transmission of *Yersinia pseudotuberculosis* in the Pork Production Chain from Farm to Slaughterhouse. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 5444–5450.
- Leal-Balbino, T.C., Leal, N.C., Lopes, C.V., and Almeida, A.M.P. de (2004). Differences in the stability of the plasmids of *Yersinia pestis* cultures in vitro: impact on virulence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* *99*, 727–732.
- Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., and Bishai, W.R. (2012). *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International* *45*, 587–602.
- Levett, P.N. (2001). *Leptospirosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 296–326.
- Li, W., and Ruan, K. (2009). MicroRNA detection by microarray. *Anal. Bioanal. Chem.* *394*, 1117–1124.
- Li, T.-C., Ami, Y., Suzaki, Y., Yasuda, S.P., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takeda, N., and Takaji, W. (2013a). Characterization of full genome of rat hepatitis E virus strain from Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* *19*, 115–118.
- Li, W., Guan, D., Su, J., Takeda, N., Wakita, T., Li, T.-C., and Ke, C.W. (2013b). High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. *Vet. Microbiol.* *165*, 275–280.
- Lloyd-Smith, E., Hull, M.W., Tyndall, M.W., Zhang, R., Wood, E., Montaner, J.S.G., Kerr, T., and Romney, M.G. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is prevalent in wounds of community-based injection drug users. *Epidemiol. Infect.* *138*, 713–720.

- Long, C., Jones, T.F., Vugia, D.J., Scheftel, J., Strockbine, N., Ryan, P., Shiferaw, B., Tauxe, R.V., and Gould, L.H. (2010). *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* Infections, FoodNet, 1996–2007. *Emerg. Infect. Dis.* *16*, 566–567.
- Van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A., and Kluytmans, J. (2007). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg. Infect. Dis.* *13*, 1834–1839.
- Ludwig, K., Sarkim, V., Bitzan, M., Karmali, M.A., Bobrowski, C., Ruder, H., Laufs, R., Sobottka, I., Petric, M., Karch, H., et al. (2002). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and antibodies against Stx2 and Stx1 in household contacts of children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* *40*, 1773–1782.
- Mäki-Ikola, O., Heesemann, J., Toivanen, A., and Granfors, K. (1997). High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany. *Rheumatol. Int.* *16*, 227–229.
- Maude, R.R., Maude, R.J., Ghose, A., Amin, M.R., Islam, M.B., Ali, M., Bari, M.S., Majumder, M.I., Tanganuchitcharnchai, A., Dondorp, A.M., et al. (2014). Serosurveillance of *Orientia tsutsugamushi* and *Rickettsia typhi* in Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *91*, 580–583.
- Maurin, M., Eb, F., Etienne, J., and Raoult, D. (1997). Serological cross-reactions between *Bartonella* and *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* *35*, 2283–2287.
- McElroy, K.M., Blagburn, B.L., Breitschwerdt, E.B., Mead, P.S., and McQuiston, J.H. (2010). Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends Parasitol.* *26*, 197–204.
- Meerburg, B.G., Jacobs-Reitsma, W.F., Wagenaar, J.A., and Kijlstra, A. (2006). Presence of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in wild small mammals on organic farms. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 960–962.
- Meerburg, B.G., Singleton, G.R., and Kijlstra, A. (2009). Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit. Rev. Microbiol.* *35*, 221–270.
- Meites, E., Jay, M.T., Deresinski, S., Shieh, W.-J., Zaki, S.R., Tompkins, L., and Smith, D.S. (2004). Reemerging leptospirosis, California. *Emerg. Infect. Dis.* *10*, 406–412.
- Meng, X.-J. (2011). From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* *161*, 23–30.
- Merhej, V., and Raoult, D. (2011). Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *86*, 379–405.
- Mertens, M., Hofmann, J., Petraityte-Burneikiene, R., Ziller, M., Sasnauskas, K., Friedrich, R., Niederstrasser, O., Krüger, D.H., Groschup, M.H., Petri, E., et al. (2011). Seroprevalence study in forestry workers of a non-endemic region in eastern Germany reveals infections by Tula and Dobrava-Belgrade hantaviruses. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* *200*, 263–268.
- Meyer, K., Stewart-Anderson, B., and Eddie, B. (1938). “Canicola fever”, a professional health hazard. *93*, 332–333.
- Le Moine, V., Vannier, P., and Jestin, A. (1987). Microbiological studies of wild rodents in farms as carriers of pig infectious agents. *Prev. Vet. Med.* *4*, 399–408.
- Moinet, M., Fournier-Chambrillon, C., André-Fontaine, G., Aulagnier, S., Mesplède, A., Blanchard, B., Descarsin, V., Dumas, P., Dumas, Y., Coïc, C., et al. (2010). Leptospirosis in free-ranging

endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (Mustelidae, Viverridae) from southwestern France. *J. Wildl. Dis.* 46, 1141–1151.

Monahan, A.M., Miller, I.S., and Nally, J.E. (2009). Leptospirosis: risks during recreational activities. *J. Appl. Microbiol.* 107, 707–716.

Monecke, S., Monecke, H., and Monecke, J. (2009). Modelling the black death. A historical case study and implications for the epidemiology of bubonic plague. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 299, 582–593.

Montoya, J.G., and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965–1976.

Morgan, J., Bornstein, S.L., Karpati, A.M., Bruce, M., Bolin, C.A., Austin, C.C., Woods, C.W., Lingappa, J., Langkop, C., Davis, B., et al. (2002). Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 34, 1593–1599.

Mosallanejad, B., Avizeh, R., Jalali, M.H.R., and Hamidinejat, H. (2012). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* Among Wild Rats (*Rattus rattus*) in Ahvaz District, Southwestern Iran. *Jundishapur J Microbiol* 5, 332–335.

Murrell, K.D., Lichtenfels, R.J., Zarlenga, D.S., and Pozio, E. (2000). The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. *Vet. Parasitol.* 93, 293–307.

Murugaiyan, J, R.U. (2011). Evaluation of *S. pseudintermedius* differentiation using molecular marker analysis and MALDI TOF MS. *Int. J. Med. Microbiol.* 301S1, 9.

Myint, K.S.A., Endy, T.P., Gibbons, R.V., Laras, K., Mammen, M.P., Sedyaningsih, E.R., Seriwatana, J., Glass, J.S., Narupiti, S., and Corwin, A.L. (2006). Evaluation of diagnostic assays for hepatitis E virus in outbreak settings. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1581–1583.

Newell, D.G., and Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4343–4351.

Nielsen, E.M., Skov, M.N., Madsen, J.J., Lodal, J., Jespersen, J.B., and Baggesen, D.L. (2004). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6944–6947.

Ninove, L., Domart, Y., Vervel, C., Voinot, C., Salez, N., Raoult, D., Meyer, H., Capek, I., Zandotti, C., and Charrel, R.N. (2009). Cowpox virus transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 781–784.

Nkogwe, C., Raletobana, J., Stewart-Johnson, A., Suepaul, S., and Adesiyun, A. (2011). Frequency of Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Campylobacter* spp. in the Faeces of Wild Rats (*Rattus* spp.) in Trinidad and Tobago. *Vet. Med. Int.* 2011, 686923.

Ojukwu, I.C., and Christy, C. (2002). Rat-bite fever in children: case report and review. *Scand. J. Infect. Dis.* 34, 474–477.

Oliveira, D.C., Tomasz, A., and de Lencastre, H. (2002). Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect. Dis.* 2, 180–189.

Otter, J.A., and French, G.L. (2010). Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect. Dis.* 10, 227–239.

- Pahlitzsch, R., Hammarin, A.-L., and Widell, A. (2006). A case of facial cellulitis and necrotizing lymphadenitis due to cowpox virus infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *43*, 737–742.
- Pantosti, A. (2012). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health. *Front. Microbiol.* *3*, 127.
- Pappas, G., Roussos, N., and Falagas, M.E. (2009). Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* *39*, 1385–1394.
- Paul, N.C., Moodley, A., Ghibaud, G., and Guardabassi, L. (2011). Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. *Zoonoses Public Health* *58*, 533–539.
- Perrocheau, A., and Perolat, P. (1997). Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year survey. *Eur. J. Epidemiol.* *13*, 161–167.
- Perry, R.D., and Fetherston, J.D. (1997). *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin. Microbiol. Rev.* *10*, 35–66.
- Picardeau, M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine Mal. Infect.* *43*, 1–9.
- Purcell, R.H., Engle, R.E., Rood, M.P., Kabrane-Lazizi, Y., Nguyen, H.T., Govindarajan, S., St Claire, M., and Emerson, S.U. (2011). Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* *17*, 2216–2222.
- Rahelinirina, S., Duplantier, J.M., Ratovonjato, J., Ramilijaona, O., Ratsimba, M., and Rahalison, L. (2010). Study on the movement of *Rattus rattus* and evaluation of the plague dispersion in Madagascar. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* *10*, 77–84.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S.A., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N.R., Chaudhuri, R., et al. (2008). The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* *190*, 6881–6893.
- Reuter, G., Fodor, D., Kátai, A., and Szucs, G. (2006). Identification of a novel variant of human hepatitis E virus in Hungary. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *36*, 100–102.
- Reuter, G., Fodor, D., Forgách, P., Kátai, A., and Szucs, G. (2009). Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *44*, 277–281.
- Riehm, J.M., Rahalison, L., Scholz, H.C., Thoma, B., Pfeffer, M., Razanakoto, L.M., Al Dahouk, S., Neubauer, H., and Tomaso, H. (2011). Detection of *Yersinia pestis* using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. *Mol. Cell. Probes* *25*, 8–12.
- Rosner, B.M., Stark, K., and Werber, D. (2010). Epidemiology of reported *Yersinia enterocolitica* infections in Germany, 2001–2008. *BMC Public Health* *10*, 337.
- Rounds, J.M., Boxrud, D.J., Jawahir, S.L., and Smith, K.E. (2012). Dynamics of *Escherichia coli* O157:H7 outbreak detection and investigation, Minnesota 2000–2008. *Epidemiol. Infect.* *140*, 1430–1438.
- Rupnik, M., Wilcox, M.H., and Gerding, D.N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* *7*, 526–536.

- Sabine Dittrich, J.C.-V. (2013). Loop-mediated isothermal amplification for *Rickettsia typhi* (murine typhus) -- problems with diagnosis at the limit of detection. *J. Clin. Microbiol.*
- Saisongkorh, W., Rolain, J.-M., Suputtamongkol, Y., and Raoult, D. (2009). Emerging *Bartonella* in humans and animals in Asia and Australia. *J. Med. Assoc. Thai. Chotmaiher Thangphaet* 92, 707–731.
- Scott, G.M., Thomson, R., Malone-Lee, J., and Ridgway, G.L. (1988). Cross-infection between animals and man: possible feline transmission of *Staphylococcus aureus* infection in humans? *J. Hosp. Infect.* 12, 29–34.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A., and Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front. Microbiol.* 2, 200.
- Simoes, R.O., Monteiro, F.A., Sanchez, E., Thiengo, S.C., Garcia, J.S., Costa-Neto, S.F., Luque, J.L., and Maldonado, A. (2011). Endemic angiostrongyliasis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1331–1333.
- Skov, M.N., Madsen, J.J., Rahbek, C., Lodal, J., Jespersen, J.B., Jørgensen, J.C., Dietz, H.H., Chriél, M., and Baggesen, D.L. (2008). Transmission of *Salmonella* between wildlife and meat-production animals in Denmark. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1558–1568.
- Socolovschi, C., Angelakis, E., Renvoisé, A., Fournier, P.-E., Marié, J.L., Davoust, B., Stein, A., and Raoult, D. (2011). Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 15, e710–e715.
- Sorvillo, F.J., Gondo, B., Emmons, R., Ryan, P., Waterman, S.H., Tilzer, A., Andersen, E.M., Murray, R.A., and Barr, R. (1993). A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 269–273.
- Steen, S. (2011). Meticillin-resistant strains of *Staphylococcus pseudintermedius* in companion animals. *Vet. Rec.* 169, 53–54.
- Stefani, S., Chung, D.R., Lindsay, J.A., Friedrich, A.W., Kearns, A.M., Westh, H., and Mackenzie, F.M. (2012). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 273–282.
- Stürenburg, E. (2009). Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. *GMS Ger. Med. Sci.* 7.
- Sykes, J., Hartmann, K., Lunn, K., Moore, G., Stoddard, R., and Goldstein, R. (2011). 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 1–13.
- Threlfall, E.J. (2002). Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 141–148.
- Torgerson, P.R., and Mastroiacovo, P. (2013). The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* 91, 501–508.
- Tsai, Y.-L., Chang, C.-C., Chuang, S.-T., and Chomel, B.B. (2011). *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 299–314.

- Uyttendaele, M., Vanwildemeersch, K., and Debevere, J. (2003). Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol.* *37*, 386–391.
- Vestey, J.P., Yirrell, D.L., and Aldridge, R.D. (1991). Cowpox/catpox infection. *Br. J. Dermatol.* *124*, 74–78.
- Vogel, S., Sárdy, M., Glos, K., Korting, H.C., Ruzicka, T., and Wollenberg, A. (2012). The Munich outbreak of cutaneous cowpox infection: transmission by infected pet rats. *Acta Derm. Venereol.* *92*, 126–131.
- Walter, G., Botelho-Nevers, E., Socolovschi, C., Raoult, D., and Parola, P. (2012). Murine typhus in returned travelers: a report of thirty-two cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *86*, 1049–1053.
- Wang, Q.-P., Lai, D.-H., Zhu, X.-Q., Chen, X.-G., and Lun, Z.-R. (2008). Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect. Dis.* *8*, 621–630.
- Wang, Q.-P., Wu, Z.-D., Wei, J., Owen, R.L., and Lun, Z.-R. (2012). Human Angiostrongylus cantonensis: an update. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* *31*, 389–395.
- Webster, J.P. (1994). Prevalence and transmission of *Toxoplasma gondii* in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. *Parasitology* *108* ( Pt 4), 407–411.
- Webster, J.P. (2001). Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behaviour. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* *3*, 1037–1045.
- Weese, J.S., and van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* *140*, 418–429.
- Weese, J.S., Archambault, M., Willey, B.M., Hearn, P., Kreiswirth, B.N., Said-Salim, B., McGeer, A., Likhoshvay, Y., Prescott, J.F., and Low, D.E. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000–2002. *Emerg. Infect. Dis.* *11*, 430–435.
- Williams, E.S., and Barker, I.K. (2001). *Infectious Diseases of Wild Mammals* (Iowa State University Press.).
- Wojciechowska, B., Mikulska-Skupień, E., Platt-Samoraj, A., Szczerba-Turek, A., and Szweda, W. (2010). Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in canine excrements contaminating urban lawns. *Bull Vet Inst Pulawy* *54*, 153–159.
- Wolfs, T.F.W., Wagenaar, J.A., Niesters, H.G.M., and Osterhaus, A.D.M.E. (2002). Rat-to-Human Transmission of Cowpox Infection. *Emerg. Infect. Dis.* *8*, 1495–1496.
- Yanagihara, Y., Villanueva, S.Y.A.M., Yoshida, S.-I., Okamoto, Y., and Masuzawa, T. (2007). Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* *30*, 399–413.
- Yin, C.-C., He, Y., Zhou, D.-H., Yan, C., He, X.-H., Wu, S.-M., Zhou, Y., Yuan, Z.-G., Lin, R.-Q., and Zhu, X.Q. (2010). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Rats in Southern China. *J. Parasitol.* *96*, 1233–1234.
- Yokoyama, E., Maruyama, S., Kabeya, H., Hara, S., Sata, S., Kuroki, T., and Yamamoto, T. (2007). Prevalence and Genetic Properties of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Definitive Phage Type 104 Isolated from *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* House Rats in Yokohama City, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 2624–2630.



- Young, D.M., Harris, H.W., Charlebois, E.D., Chambers, H., Campbell, A., Perdreau-Remington, F., Lee, C., Mankani, M., Mackersie, R., and Schechter, W.P. (2004). An epidemic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* soft tissue infections among medically underserved patients. *Arch. Surg. Chic. Ill* 1960 139, 947–951; discussion 951–953.
- Zetola, N., Francis, J.S., Nuermberger, E.L., and Bishai, W.R. (2005). Community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect. Dis.* 5, 275–286.
- Zhou, D., and Yang, R. (2009). Molecular Darwinian evolution of virulence in *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.* 77, 2242–2250.
- Zietz, B.P., and Dunkelberg, H. (2004). The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 165–178.
- Zimba, M., Pfukenyi, D., Loveridge, J., and Mukaratirwa, S. (2011). Seasonal abundance of plague vector *Xenopsylla brasiliensis* from rodents captured in three habitat types of periurban suburbs of Harare, Zimbabwe. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* 11, 1187–1192.

Annexe 2

La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France:

Impact économique de l'infection

Bulletin des GTV, 2013, n°69: p. 61-67

Florence Ayrat

Par Florence AYRAL

Résidente du Collège européen de Santé publique vétérinaire  
 Université de Lyon, VetAgro Sup, USC 1233, Équipe PERS, F-69280, MARCY-L'ÉTOILE  
 florence.ayral@vetagro-sup.fr

# La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France : impact économique de l'infection

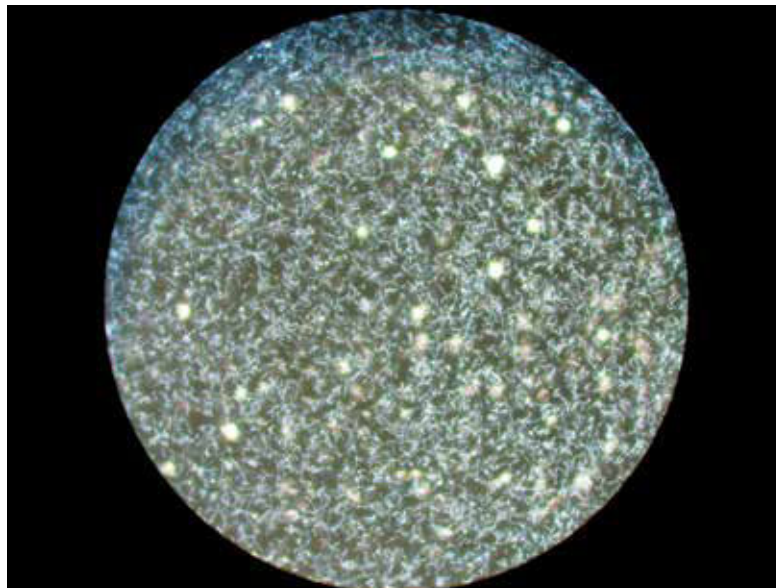
L'infection par les leptospires est souvent sous-diagnostiquée en France et entraîne un manque à gagner non négligeable pour l'éleveur. La connaissance des coûts engendrés par l'infection peut apporter une aide décisionnelle.

## RÉSUMÉ

L'infection des bovins par l'agent de la leptospirose, bactéries du genre *Leptospira*, entraîne une atteinte des performances de reproduction du cheptel. Cette infection est fréquente chez les bovins laitiers en France, mais souvent sous-diagnostiquée. Son impact englobe de nombreux indicateurs de santé du troupeau tels que le taux de conception, l'intervalle vêlage-saillie fécondante, la production laitière et le taux de réforme, bien que les signes cliniques soient souvent frustes et limités à une baisse de la fertilité ou à des avortements. Le coût annuel de l'infection a été estimé à une perte qui varie, selon la gestion de l'éleveur, de 88 € à 2 369 € par vache avortée. Cette analyse est nécessaire à l'évaluation économique ultérieure des mesures de lutte.

La quantification de l'impact économique des maladies est un outil essentiel pour la gestion de l'élevage. Le coût relatif aux infections est souvent sous-estimé par l'absence de prise en compte des conséquences indirectes, telles que le travail supplémentaire associé au traitement des animaux malades ou la dépréciation des animaux.

En France, la séroprévalence de l'agent de la leptospirose (*Leptospira interrogans sensus lato*) dans les cheptels bovins laitiers varie de 18 % à 35 % selon les études (1, 2). Les conséquences de l'infection se distinguent selon le statut de l'élevage en regard des leptospires (Photo 1). Parmi les élevages infectés, la forme enzootique est la plus répandue ; elle est due à l'infection chroniques par *Leptospira* sérovar hardjo d'une partie des bovins et se manifeste à l'échelle du troupeau par une diminution de la fertilité (3). En revanche, dans les élevages naïfs pour *Leptospira* quel que soit le sérovar, de la fièvre, des avortements et des chutes de production laitière sont observés. Plus rarement, le « milk drop syndrome » (lait rosé sans inflammation apparente de la mamelle) peut se manifester. Le coût réel de la baisse de fertilité dépend de multiples variables (nombre d'inséminations nécessaires, longévité de la vache, intervalle vêlage-vêlage, taux de conception, décalage de



Cliché : DR

la lactation). De même, le coût relatif à un avortement ne se limite pas à la valeur du veau mort, il doit prendre en compte un certain nombre de pertes indirectes (gestion du post-partum, conséquences sur la lactation, dépréciation de la vache), voire de gains (alimentation non distribuée). L'objectif de cette étude était de définir les principales pertes en termes de production et d'évaluer leurs coûts, à l'échelle d'un individu et pour une année. Ces coûts peuvent ensuite être extrapolés à

**Photo 1.**  
 Leptospires vues au microscope (x200). En France, la séroprévalence de l'agent de la leptospirose (*Leptospira interrogans*) varie de 18 % à 35 % selon les études.

l'échelle de l'élevage selon le nombre d'individus atteints et les méthodes de gestion de l'élevage.

## Effets de l'infection, définition des pertes de production, calcul des coûts relatifs

### Infertilité lors d'infection chronique

Les infections chroniques par *Leptospira* sérovar hardjo ont un impact sur la fertilité qui peut être mis en évidence à l'échelle du troupeau par des indicateurs de santé tels que l'augmentation de l'intervalle vêlage-saillie fécondante et la baisse du taux de conception (proportion de vaches ayant un diagnostic de gestation positif parmi les vaches inséminées) (4).

Plusieurs études comparant le profil sérologique des individus permettent d'évaluer la modification d'indicateurs de santé et de paramétrer ainsi les pertes. Le retour tardif des chaleurs a été évalué à plus de 25 jours chez des bovins séropositifs pour *Leptospira* en Bretagne (5) et une augmentation de l'intervalle vêlage-saillie fécondante d'en moyenne

37 jours a été estimée par ailleurs (6). L'évaluation de l'impact économique de l'infertilité se base sur ce délai de 37 jours (1,8 chaleur), au cours duquel le nombre d'insémination va dépendre du taux de détection des chaleurs. Dans cette analyse, le taux de détection des chaleurs est fixé à 70 %.

La non-fécondation entraîne des coûts liés à l'achat de semences supplémentaires et d'outils de prise en charge de la reproduction (main-d'œuvre, hormones, dispositifs de détection des chaleurs, examens par le vétérinaire). Ces variables financières ont été définies et considérées pour le calcul du coût relatif à l'infertilité d'une vache infectée par les leptospires.

### Avortements

Le tropisme utérin des leptospires peut être à l'origine de mortalité embryonnaire précoce. Cependant, la grande majorité des avortements associés à la leptospirose est rapportée dans le dernier tiers de gestation (7).

La perte du veau et la dévalorisation du troupeau sont les pertes directes conséquentes à l'avortement. Les pertes indirectes sont liées à la dépréciation de la vache avec des conséquences sur la production laitière et la fertilité. Bien que l'avortement puisse impliquer la prolongation de la lactation ou le démarrage précoce d'une nouvelle lactation chez les tarées, une perte est estimée à 3,5 % de la lactation attendue (315 kg de lait pour une lactation de 9 000 kg) (8). Concernant la remise en question du potentiel reproducteur de l'animal, l'intervalle vêlage-vêlage a été estimé à 144 jours (6,8 chaleurs) de plus chez les vaches avortées (529 jours) par rapport aux vaches non avortées (395 jours) (8). La dépréciation de l'animal peut impliquer sa réforme prématurée qui, elle aussi, représente un coût (9). Toutefois, certains effets sont positifs et induisent un gain financier comme la prolongation de la lactation et le gain de nourriture non distribuée. L'ensemble de ces paramètres ont été considérés dans le coût d'un avortement leptospiroïque.

Le troupeau est dévalorisé si les animaux perdus ou dépréciés ne sont pas remplacés; en revanche, la valeur du troupeau est stable si les animaux sont remplacés. Les pertes et gains associés à la leptospirose bovine sont donc variables selon la stratégie de l'éleveur (Tableaux 1 et 2).

### Méthode de calcul

Dans la comptabilité agricole, la production animale est calculée annuellement. Elle est égale à la production d'animaux et de produits d'origine animale, moins la valeur des animaux achetés, et plus la variation de la valeur du trou-

**TABEAU 1. Bilan des coûts et gains sur la production lors de leptospirose bovine, approche selon laquelle une baisse de la valeur financière du troupeau est acceptée (non-renouvellement des animaux atteints)**

Revenus supplémentaires	Manque à gagner
Production laitière persistante	Avorton = perte d'un veau
	Ventes de veaux
	Perte de lait sur le long terme (due au vieillissement du troupeau et à l'impact de la leptospirose)
	Baisse du taux de conception
Coûts réduits	Coûts supplémentaires
Nourriture (lait en poudre, concentrés, foin)	Frais vétérinaires
Litière (paille)	Inséminations répétées
	Traitements hormonaux
	Main-d'œuvre

**TABEAU 2. Bilan des coûts et gains sur la production lors de leptospirose bovine, approche selon laquelle une baisse de la valeur financière du troupeau est refusée (renouvellement des animaux atteints)**

Revenus supplémentaires	Revenus perdus
Réformes (valeur bouchère)	Avorton = perte d'un veau (vendu à 8 jours, engraisé puis vendu ou gardé pour le renouvellement du troupeau)
Coûts réduits	Coûts supplémentaires
Aucun	Remplacement du veau
	Remplacement des vaches avortées
	Augmentation du taux de réforme

peau. En effet, la valeur du troupeau en tant que bilan des entrées-sorties et des naissances-morts doit être prise en compte dans le coût de l'infection, qui peut impliquer de la mortalité, des réformes ou des achats de remplacement.

$$\text{Coût}_{\text{production animale}} = \text{Gain}_{\text{production}} - \text{Valeur}_{\text{achats animaux}} + \Delta \text{Valeur}_{\text{troupeau}}$$

Ainsi défini (10), le coût de la production animale résume les entrées et les sorties, et inclut tous les éléments sur lesquels l'infection peut avoir un effet. À cela s'ajoutent les charges opérationnelles telles que la main-d'œuvre, les aliments, les médicaments.

Le coût associé à l'infection leptospirosique

(1) FranceAgriMer 2012, données sur la cotation des veaux laitiers.

(2) Barèmes du SMIC (coût de revient 12,15 € par heure, pour l'employeur).

chronique se limite à la baisse de fertilité, alors que le coût de la maladie inclut les pertes liées aux avortements. L'étape suivante vise à évaluer, à l'échelle d'un individu et d'une année, le coût associé à une infertilité de 37 jours (1,8 chaleur) et le coût associé à un avortement (veau mort, modification de la production laitière, infertilité de 144 jours), selon le mode de gestion de l'éleveur.

## Évaluation des coûts liés à l'infection

### Coût associé à la baisse de fertilité lors d'infection chronique

Le coût moyen d'une insémination artificielle (IA) est estimé à 35 €, soit une perte de 44 € ( $35 \times 1,8 \times 0,7$ ). Dans un contexte de troubles de la fertilité, le recours aux traitements hormonaux et à l'expertise d'un professionnel est fréquent, l'ensemble de ces coûts est estimé à 15 €. Dans un premier temps, la lactation est prolongée dans sa période la moins rentable (fin de lactation), rapportant 178 € (production moyenne de 15 kg de lait par jour, pendant 37 jours). L'année 1, la baisse de la fertilité ne se manifeste pas par une perte réelle mais reste un gain de 119 €, malgré la perte de rentabilité (Encadré 1). La perte de rentabilité va s'accroître les années suivantes avec le décalage des lactations et la diminution du taux de conception.

### Coût associé à un avortement leptospirosique

#### ► Perte du veau

La valeur d'un veau laitier de moins de 8 jours est variable au cours du temps. Elle est estimée à 160 € en moyenne (120 à 200 €<sup>(1)</sup>), valeur plus probablement attribuée aux femelles). Dans la mesure où le veau n'est pas remplacé, la valeur du troupeau est diminuée d'autant. La perte du veau entraîne un manque à gagner de sa valeur bouchère. Le coût de la production animale étant évalué sur l'année en cours, la valeur du veau est estimée à 12 mois (environ 350 kg poids vif), soit 450 €. Le temps de travail supplémentaire associé à la gestion de l'avortement est évalué à 2 heures<sup>(2)</sup>.

Des gains sont associés à la perte du veau en termes de nourriture et de litière non distribuées et sont estimés à 475 € (Tableau 3). Le coût total associé à la perte d'un veau et répercuté sur l'année est de 159 € (Encadré 2).

Lorsque la stratégie économique de l'éleveur

## Encadré 1. Coût relatif à la baisse de fertilité lors d'infection chronique l'année 1

$$\text{Coût}_{\text{baisse de fertilité}} = \text{Coût}_{\text{inséminations répétées}} + \text{Coût}_{\text{traitements hormonaux}} + \text{Coût} / - \text{Gain}_{\text{perte de lait}}$$

$$\text{Coût}_{\text{baisse de fertilité}} = -44 - 15 + 178$$

$$\text{Gain}_{\text{baisse de fertilité}} = 119 \text{ €}$$

TABLEAU 3. Évaluation des coûts alimentaires (lait en poudre, foin, concentrés) et de structure (paille, entretien des bâtiments) d'un veau laitier la première année  
Source : « Bilan génisses 2011-2012 » de Bretagne conseil élevage Ouest

	Structure	Alimentation	Total
Référence	0,8 €/jour	0,5 €/jour	
Veau de 12 mois (350 kg)	292 €	182,5 €	475 €

## Encadré 2. Coût relatif à la perte d'un veau

$$\text{Coût}_{\text{perte veau}} = \text{Valeur bouchère}_{\text{veau de 12 mois}} - \text{Gain}_{\text{soins du veau}} + \text{Coût}_{\text{temps de travail}} + \Delta \text{Valeur}_{\text{troupeau}}$$

$$\text{Coût}_{\text{perte veau}} = -450 + 475 - 24 - 160 = 159 \text{ €}$$

(3) Coût de revient du litre de lait 0,32 € selon l'Office de l'élevage.

implique le remplacement du veau mort pour éviter toute dévalorisation du troupeau et perte de production, l'impact économique de la perte du veau est alors le coût de l'achat de l'animal de remplacement (160 €<sup>(1)</sup>) ajoutés aux surcoûts de temps de travail (24 €) soit, un total de 184 €.

### ► Perte/gain de lait chez la vache avortée

Lorsque la vache est tarie et reprend une lactation à la suite de l'avortement, la perte est estimée à 315 kg (3,5 % de la lactation), soit un coût de 100 €<sup>(3)</sup>.

Si la vache est en fin de lactation, une prolongation de celle-ci remplace la période de tarissement, et une production supplémentaire d'en moyenne 20 kg/j est considérée pendant 2 mois. Elle représente un gain de 384 € comparé à la période de référence (Figure 1).

Toutefois, cette production reste soumise à la perte de lait post-abortive de 100 €. Le coût de l'infection sur la production laitière est, malgré le moindre niveau de production, un gain de 284 € (= 384 – 100) du fait de sa persistance sur l'année 1. Ce gain est en partie absorbé par le coût moyen des inséminations artificielles, estimé à 167 € (35 x 6,8 x 0,7) et le recours aux traitements hormonaux estimé à 45 € (3 tentatives) (Encadré 3).

Les pertes seront effectives l'année 2 lorsque les conséquences de l'infertilité consécutive à l'avortement se seront répercutées. Elles ne sont pas considérées dans cette analyse.

## Encadré 3. Coût relatif à la baisse de fertilité à la suite d'un avortement durant l'année 1

$$\begin{aligned} \text{Coût}_{\text{baisse de fertilité}} &= \text{Coût}_{\text{inséminations répétées}} \\ &+ \text{Coût}_{\text{traitements hormonaux}} \\ &+ \text{Coût} / - \text{Gain}_{\text{perte de lait}} \end{aligned}$$

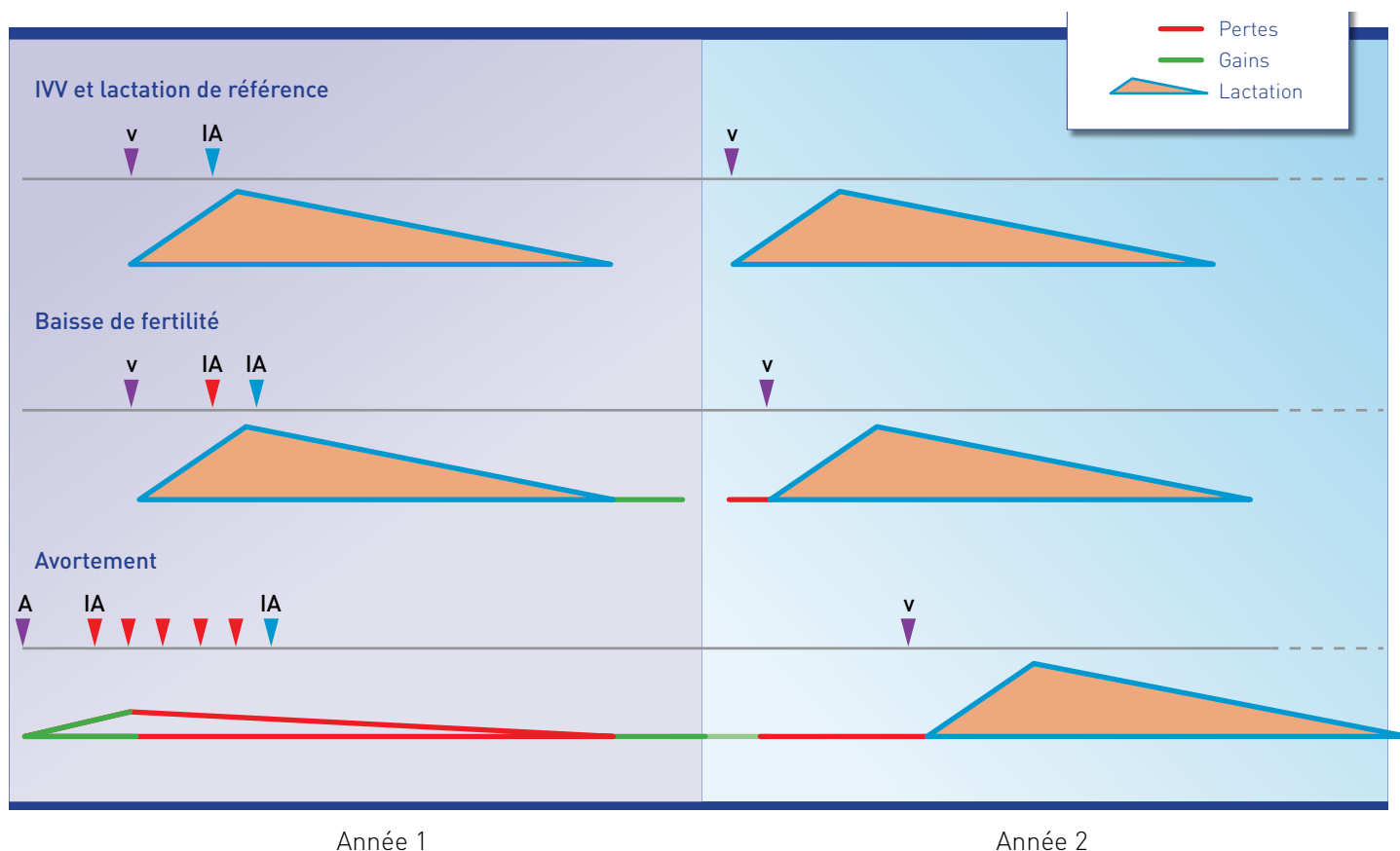
$$\text{Coût}_{\text{baisse de fertilité}} = -167 - 45 + 284$$

$$\text{Gain}_{\text{baisse de fertilité}} = 72 \text{ €}$$

Figure 1.

Comparaison des pertes et gains de production selon les conséquences de l'infection à *Leptospira*.

Le moment de vêlage (v), d'avortement (A) et d'insémination artificielle (IA) sont signalés sur une ligne de temps et mettent en évidence le décalage des événements dans le temps selon les cas.



## Coût de gestion de la vache avortée ou infertile

Deux stratégies économiques sont possibles face aux pertes associées à la vache avortée (production laitière, fertilité), l'acceptation de la dévalorisation de production ou le refus de cette dévalorisation par la réforme de la vache avortée et, éventuellement, son remplacement. Les gains associés à la réforme de l'animal et à son non-remplacement (gain de soins, **Tableau 4**) sont estimés respectivement à 800 €<sup>(4)</sup> et à 1 195 €. Le manque à gagner lié à la perte de lait est estimé pour une lactation de 9 000 kg à un coût de 2 880 €<sup>(5)</sup>. La réforme de la vache avortée implique une dévalorisation de la valeur du troupeau d'environ 1 300 €<sup>(6)</sup>. Le coût total associé la réforme de la vache avortée sans remplacement est estimé à une perte de 2 185 € (**Encadré 4**). Si la stratégie de l'éleveur est d'éviter toute dévalorisation du troupeau et toute perte de production, la vache avortée est réformée et remplacée. Le coût associé est estimé à 500 € (= 1 300 – 800). Le coût total impliqué, sur l'année 1, lors d'un avortement leptospirosique, varie de 88 € à 2 369 € selon la stratégie de l'éleveur (**Tableau 5**).

**TABEAU 4.** Évaluation des besoins en alimentation et litière d'une vache laitière sur une année avec 5 mois de présence en bâtiments, et évaluation des coûts associés

Source : « Critères technico-économiques », CER France Côtes-d'Armor, 3<sup>e</sup> trimestre 2012

	Litière	Concentrés	Fourrages	Total
<i>Référence</i>	10 kg/j /VL	68 €/1 000 L produits	47 €/1 000 L produits	
<i>Coût / lactation</i>	160	612	423	1 195

### Encadré 4. Coût relatif à la réforme de la vache avortée, sans remplacement

$$\begin{aligned} \text{Coût total}_{\text{réforme sans remplacement}} &= - \text{Gain}_{\text{valeur bouchère}} \\ &+ \text{Coût}_{\text{perte de production laitière}} \\ &- \text{Gain}_{\text{soins}} \\ &+ \Delta \text{Valeur}_{\text{troupeau}} \end{aligned}$$

$$\text{Coût total}_{\text{réforme sans remplacement}} = 800 - 2 880 + 1 195 - 1 300$$

$$\text{Coût total}_{\text{réforme sans remplacement}} = - 2 185 \text{ €}$$

(4) Données issues des cotations des bovins à l'abattoir, FranceAgriMer janvier 2012.

(5) 0,32 €/kg de lait.

(6) Valeur moyenne d'une vache non gestante, la valeur du veau étant évaluée par ailleurs.

**TABEAU 5.** Les coûts de la leptospirose selon la stratégie de l'éleveur

TABLEAU 5. Les coûts de la leptospirose selon la stratégie de l'éleveur							VEAU MORT						
							Remplacé		Non remplacé				
							Équarissage**	-	Équarissage	-			
							Veau	- 160 €	Veau non vendu	- 450 €			
									Soin, nourriture	475 €			
							Baisse valeur troupeau	0,00 €	Baisse valeur troupeau	- 160 €			
Main-d'œuvre	- 24 €	Main-d'œuvre	- 24 €										
Total	- 184 €	Total	- 160 €										
VACHE AVORTÉE	Réforme	Valeur bouchère	800 €	Non remplacement	Production laitière*	- 2 880 €	- 2 369 €	- 2 345 €					
					Baisse valeur troupeau	- 1 300 €							
					Soins, nourriture	1 195 €							
					Total	- 2 185 €							
		Valeur bouchère	800 €	Remplacement	Vache non gestante	- 1 300 €							
					Total	- 500 €							
					Conservation de l'animal					Production laitière	284 €	- 112 €	- 88 €
										Baisse de la fertilité	- 212 €		
	Baisse valeur troupeau	0,00 €											
	Total	72 €											

\* Pour une lactation de 9 000 kg.

\*\* Le coût de l'équarissage est une cotisation annuelle. La part impliquée dans le retrait du veau dépend des autres cadavres relevés dans l'année et, de ce fait, n'a pas été prise en compte dans le calcul.



## Mise en perspective des résultats

### Estimation du coût relatif à infertilité

Paradoxalement, la baisse de fertilité aboutit à un gain de production de 119 € l'année 1, malgré une perte de rentabilité (Tableau 5). Cette estimation ne tient pas compte de pertes indirectes liées à l'alimentation d'un animal non productif, au décalage de la lactation et à la baisse du taux de conception qui se répercutera les années suivantes. Un modèle d'évaluation de l'impact économique d'une mauvaise fertilité en élevage laitier a été établi par l'INRA en 1988 (11). Il estime la perte associée à une baisse du taux de conception de 1 % selon le niveau de reproduction de l'élevage. Dans les élevages où le taux de conception est de 60 %, une baisse de 1 % entraîne un coût de 3 €/vache/an<sup>(7)</sup>. Dans les élevages où le taux de conception est de 45 %, une baisse de 1 % entraîne un coût de 5 €/vache/an<sup>(5)</sup>. Par conséquent, une baisse du taux de conception de 1 % implique, pour un élevage de 100 vaches en lactation, une perte de 300 à 500 € par an. Cette valeur de 1 % est indicative et représente une perte minimale. Elle doit être ajustée au cas par cas selon les indicateurs de l'élevage. Ces résultats mettent en perspective les pertes sur le long terme et soulignent les limites d'une approche d'évaluation des coûts sur une seule année.

### Estimation du coût relatif à un avortement

Les avortements leptospiroïques seraient souvent le résultat d'une co-infection avec d'autres pathogènes tels que *Neospora caninum*, le virus de la fièvre catarrhale ovine, le virus de la diarrhée bovine ou le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (7). Dans le cas de co-infection, la part attribuée à chaque pathogène ne peut pas être définie. Si les leptospires ne sont pas les seuls pathogènes, ils n'en sont pas moins impliqués, de manière probable, dans ces avortements. D'après une étude séro-

logique en Bretagne, la prévalence des leptospires était significativement ( $P < 10^{-4}$ ) plus importante chez les vaches ayant avorté (18 %) par rapport au groupe témoin (7,4 %) (12).

Estimer les effets des avortements sur les performances de la reproduction est limité par l'impact d'autres acteurs tels que les variations saisonnières, la parité, le niveau de production, la persistance de la lactation, le type d'élevage et de gestion des remplacements. Aux États-Unis, Kirk a rapporté en 2003 que le coût des avortements en fin de gestation variait de 500 \$US (385 €) à 900 \$US (693 €), augmenté à 1 000 \$ (770 €) lors de remplacement prématuré (13). Les différences majeures entre la gestion des élevages aux États-Unis et en France ne permettent pas de comparer directement ces résultats, cependant la réforme de l'animal déprécié reste la stratégie la plus coûteuse, que ce soit en France ou aux États-Unis.

## Conclusion

La reproduction et la production laitière sont les aspects les plus importants dans la rentabilité d'une ferme laitière (14). En ayant un impact sur ces paramètres, les infections par *Leptospira* impliquent des conséquences économiques non négligeables et souvent sous-estimées par l'aspect fruste et non spécifique des manifestations cliniques.

L'infection des bovins par les leptospires est protéiforme, ce qui rend l'évaluation de l'impact économique complexe. Toutefois, le découpage des effets de l'infection (baisse de fertilité, avortements) en conséquences élémentaires sur la production (mort du veau, perte de production laitière), puis leur conversion en termes financiers, permet d'estimer l'impact économique de l'infection à un coût annuel de 88 à 2 369 € par vache avortée. À l'échelle de l'élevage, le coût de l'infection est additif selon le nombre de vaches infectées et les manifestations observées. Quelle que soit la gestion de l'élevage, l'impact économique de l'infection n'est pas négligeable et des mesures de lutte doivent être envisagées.

### Remerciements :

Pr. Marc Artois et Pr. Angeli Kodjo (Laboratoire des Leptospires – Lyon) pour leurs contributions au contenu de l'article, Philippe Couepel (éleveur dans les Côtes-d'Armor) pour son support technique. Ce travail a été fait dans la continuité de l'atelier ECVPH-ECBMH à l'Institut de Santé publique vétérinaire – Université de Berne (février 2012) et a été conduit dans le cadre du projet Européen WildTech (permis de bourse n° 222633).

(7) Valeur ajustée sur le taux d'inflation entre 1988 et 2012



## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ANDRÉ-FONTAINE G, NICHOLAS D, SCALZO B, KETA A, NANJIANI IA. *Prévalence sérologique de la leptospirose à Leptospira sérovar hardjo chez les bovins femelles adultes en France en 2004*. Bulletin des GTV, 2010, n°55: p. 67-74.
- 2 - TRESSE L, RUBEAUX D, KODJO A, ANDRÉ-FONTAINE G, MASCARON L. *Enquête sur l'infection des bovins par les leptospires en région Ouest*. Renc. Rech. Ruminants, 2009, p. 16.
- 3 - ANDRÉ-FONTAINE G, KODJO A. *Leptospirose et troubles de la reproduction chez les bovins*. Bulletin des GTV, 2009, 48: p. 53-8.
- 4 - DHALIWAL GS, MURRAY RD, DOBSON H, MONTGOMERY J, ELLIS WA. *Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of Leptospira interrogans serovar hardjo infection*. Vet. Rec. 1996, 139: p. 110-114.
- 5 - GENEST G. *Statuts individuels et de troupeaux en élevages laitiers bretons vis-à-vis de différents agents infectieux: comparaison dans 3 situations de reproduction type*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, ENVN, 2006.
- 6 - GUITIAN J, THURMOND MC, HIETALA SK. *Infertility and abortion among first-lactation dairy cows seropositive or seronegative for Leptospira interrogans serovar hardjo*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1999, 215: p. 515-518.
- 7 - TAINTURIER D, FIÉNI E, BRUYAS JF, BATTUT I. *Étiologie des avortements chez la vache*. Le Point Vétérinaire. 1997, 183, p. 13-20.
- 8 - GÄDICKE P, VIDAL R, MONTI G. *Économie effect of bovine abortion syndrome in commercial dairy herds in Southern Chile*. Prev. Vet. Med. 2010, 97: p. 9-19.
- 9 - SOL J., RENKEMA JA., *A three year herd health and management program on thirty Dutch dairy farms. 1. Objectives methods and main results*. 1986, Vet Q. 6, 141-148.
- 10 - TOMA B, DUFOUR B, BENET J, SANAA M, SHAW A, MOUTOU F. *Le coût des maladies. Épidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales majeures*. 3<sup>rd</sup> ed. p. 600.
- 11 - Boichard D. *Impact économique d'une mauvaise fertilité chez la vache laitière*. INRA Prod. Anim. 1988, 1 (4): 245-52.
- 12 - ANDRÉ-FONTAINE G, GANIERE JP, BOUKERROU A, QUINIOU MA. *Comparaison des prévalences des anticorps antileptospires entre un échantillon de vaches ayant avorté et un échantillon tiré au sort en Loire-Atlantique*. Epidémiol. Santé Anim. 1987 n°11, p. 53-63.
- 13 - KIRCK J. *Infectious abortion in dairy cows*. UC Davis. VM extension 2003.
- 14 - MEADOWS C, RAJALA-SCHULTZ PJ, FRAZER GS. *A spreadsheet based model demonstrating the nonuniform economic effects of varying reproductive performance in Ohio dairy herds*. 2005. J Dairy Sci. 88, p. 1 244-1 254.

Annexe 3

La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France:

établir un programme de lutte

Bulletin des GTV, 2013-14, n°72: p. 53-58

Florence Ayrat

Par Florence AYRAL

Résidente du Collège Européen de Santé Publique Vétérinaire  
 Université de Lyon, VetAgro Sup, USC 1233, Équipe PERS, F-69280, MARCY L'ÉTOILE  
[florence.ayral@vetagro-sup.fr](mailto:florence.ayral@vetagro-sup.fr)

# ••• La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France : établir un programme de lutte

L'impact économique de la leptospirose rend pertinente la mise en place de mesures de lutte sanitaires ou médicales, selon le séro groupe suspecté. Une étude révèle la nécessité de rendre disponibles des vaccins multivalents pour protéger les cheptels bovins laitiers français.

La leptospirose bovine est une maladie infectieuse causée par différentes espèces bactériennes du genre *Leptospira* (Photo 1). En plus d'être une zoonose menaçant la santé de l'Homme, en particulier des éleveurs bovins, la leptospirose entraîne un impact économique en diminuant les performances reproductrices des animaux (1). L'infection chronique, le plus souvent subclinique, implique une baisse de fertilité du troupeau alors que l'infection clinique, ou maladie, se manifeste le plus souvent par des avortements. Ceux-ci engendrent la perte de veaux, une baisse de fertilité et une baisse de la production de lait. Le coût d'un avortement leptospirosique est estimé à 1 043 € en moyenne ( $IC_{95\%}=[203 - 1882]$ ) la première année de l'infection, avec de probables répercussions les années suivantes (2)\*. Les pertes économiques sont fonction du nombre de bovins infectés, qui peut représenter 30 % à 40 % du troupeau (3). Ces pertes peuvent donc être considérables et soulèvent la question des mesures de lutte au sens large, visant l'amélioration des performances de troupeaux infectés, mais aussi la prévention de cheptels sains exposés.

À partir des connaissances sur l'épidémiologie de la leptospirose dans les cheptels bovins laitiers, les mesures de lutte pertinentes et disponibles en France ont été définies. Les mammifères

## RÉSUMÉ

La leptospirose bovine est sous-diagnostiquée du fait de manifestations cliniques souvent frustes et non spécifiques. Une précédente analyse a permis d'évaluer son impact économique. Elle a soulevé des questions sur les mesures de lutte : leur pertinence en regard des caractéristiques épidémiologiques de la maladie, et la comparaison de leur coût et de leurs avantages. Cette maladie plurielle est en effet causée par différents groupes de bactéries rattachées à un cycle épidémiologique particulier. Les bactéries du sérogroupes Australis, Grippotyphosa et Icterohaemorrhagiae sont souvent transmises de façon indirecte par des hôtes réservoirs issus de la faune sauvage, alors que les bactéries du séro groupe Sejroe sont essentiellement transmises par le réservoir bovin lui-même. De ces distinctions épidémiologiques découlent des mesures de lutte sanitaires dans le premier cas, et médicales dans le second. L'évaluation des bénéfices révèle que la vaccination contre l'infection par la bactérie Sejroe est, de loin, la plus rentable. Elle souligne la nécessité de rendre disponibles des vaccins multivalents pour fournir une protection adéquate des cheptels bovins en France.

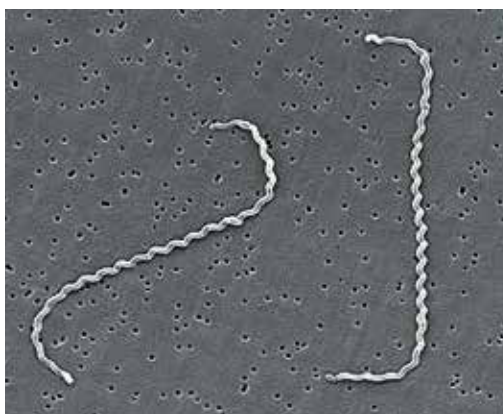


Photo 1.  
 Vue microscopique de la bactérie *Leptospira interrogans*, pouvant être l'agent d'une des leptospiroses.

Cliché : CDC/NCID/HIP/Janice Carr

de la faune sauvage et les bovins eux-mêmes sont les réservoirs potentiels des agents pathogènes. Les différentes espèces réservoirs se distinguent également en termes de sérogroupes de leptospires transmis et par conséquent, en termes de mesures de lutte disponibles et appropriées. Le coût des mesures de lutte pertinentes a été évalué pour chacun des réservoirs en cause (faune sauvage, notamment les rongeurs, versus

\* Cet article fait suite à un premier volet : « La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France : impact économique de l'infection », paru dans le Bulletin de GTV n°69, mai 2013, p. 61.

bovins). Il constitue un argument essentiel pour conseiller les éleveurs de troupeaux infectés ou sains exposés.

## Épidémiologie de l'infection par les leptospires et niveaux d'action

Afin de limiter le nombre d'individus infectés par un agent pathogène, il est nécessaire de considérer les éléments épidémiologiques clés sur lesquels les mesures de lutte peuvent s'appliquer. Les trois éléments clés de la transmission des maladies animales sont la source d'agents pathogènes, la voie de transmission et la sensibilité de l'hôte (4).

Dans le cas particulier de la leptospirose bovine, la source des agents pathogènes est l'ensemble des hôtes réservoirs (les rongeurs et les bovins eux-mêmes, pour les principaux) ainsi que l'environnement (eau, sol, nourriture) contaminé par de l'urine infectée. Les bactéries pathogènes appartenant au genre *Leptospira* sont usuellement distinguées en sérogroupes selon la méthode sérologique de référence (test de micro-agglutination). Ces sérogroupes rassemblent les leptospires communément rapportés chez une espèce hôte donnée. Ainsi défini, le séro groupe impliqué dans l'infection d'un cheptel suggère

l'espèce ou le groupe d'espèces probablement à l'origine de l'infection. Concrètement, une analyse des données de surveillance, relevées au Laboratoire des leptospires de 2008 à 2011, rapporte la prédominance des sérogroupes Australis, Sejroe, Grippotyphosa et Icterohaemorrhagiae dans les cheptels bovins en France métropolitaine (5). L'épidémiologie et la stratégie de lutte diffèrent s'il s'agit de sérogroupes dont les bovins sont eux-mêmes les réservoirs (Sejroe) ou s'il s'agit de sérogroupes ayant un spectre d'hôte plus large (Australis, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae). Dans le premier cas, le cycle épidémiologique ne prend en compte qu'une seule espèce (bovine). Dans le second cas, l'épidémiologie est compliquée par l'intervention d'un nombre potentiellement élevé d'espèces de la faune sauvage (peu maîtrisable par définition) et limite d'autant le recours aux mesures de lutte. Dans ce contexte, l'identification des sérogroupes impliqués dans les cheptels infectés est d'une importance majeure pour définir des actions pertinentes (Encadré 1).

## Mesures de lutte disponibles

Les deux grands types de mesures pouvant agir sur les éléments clés (source, transmission, hôte) sont les mesures sanitaires (actions visant

## Encadré 1. Détermination du séro groupe infectant dans un cheptel bovin

À titre d'exemple et fondé sur les connaissances de la leptospirose canine, le profil de titres présenté dans le résultat de MAT ci-dessous (MAT : technique de microagglutination de Martin et Pettit) est fortement en faveur d'une infection par des leptospires du séro groupe Australis (10). L'interprétation de ce résultat s'effectue sur la base des titres relatifs au séro groupe infectant, au moins trois fois supérieur aux autres.

*Exemple d'un résultat MAT pouvant être observé chez un bovin et basé sur les sérovars Icterohaemorrhagiae (Icter), Copenhageni (Cop), Australis (Aus), Munchen (Mun), Bratislava (Brat), Grippotyphosa (Grip), Vande-rhoedoni (Van), Sejroe, Hardjo, Saxkoebing (Sax) et Wolf.*

Séro-groupes	Icterohaemorrhagiae		Australis			Grippotyphosa		Sejroe			
Sérovars	Icter	Cop	Aus	Mun	Brat	Grip	Van	Sejroe	Hardjo	Sax	Wolf
Titres	0	0	3 200	3 200	3 200	0	0	800	0	400	0

Les résultats ne sont pas toujours aussi suggestifs et il est essentiel de vérifier la concordance des résultats obtenus chez tous les bovins prélevés. L'interprétation du séro groupe infectant doit donc être réalisée avec prudence et devra être confrontée aux éléments épidémiologiques pour lui attribuer de la crédibilité. Par exemple, dans un cheptel présentant une suspicion clinique de leptospirose, des résultats MAT compatibles avec une infection par le séro groupe Sejroe sera d'autant plus crédible que les signes cliniques seront apparus après l'introduction de bovins provenant d'un cheptel infecté par les leptospires.

à éliminer l'agent pathogène ou à éviter la contamination des individus sains) et les mesures médicales (mise en œuvre de la thérapeutique ou de la prophylaxie médicale). L'approche développée considère les mesures applicables à chaque élément clef dans le cadre particulier de la leptospirose bovine (Figure 1).

## Mesures sanitaires

Les mesures sanitaires ont une pertinence relative selon la faisabilité de leur mise en œuvre et la pénalisation financière engendrée.

Les actions sanitaires concernant la source de leptospires visent l'objectif théorique d'élimination des animaux contagieux. Lors d'infections issues de réservoirs sauvages à l'exemple du rat surmulot, du ragondin et du rat musqué, des opérations de maîtrise des populations d'espèces nuisibles (empoisonnement, captures) permettent, en principe, de limiter localement la présence de la population réservoir sur une période de quelques mois. Cette approche n'implique en aucun cas une élimination définitive des animaux infectés. Lors d'infections issues de bovins, le plus souvent asymptomatiques, le dépistage préa-

lable et l'élimination ou l'isolement des bovins infectés est la méthode théorique pour éliminer la source de pathogènes. Le dépistage (MAT sur sérum pairé à 3 semaines d'intervalle) permet de détecter une partie des bovins infectés. Cependant, des bovins porteurs et potentiellement excréteurs peuvent être associés à un résultat sérologique négatif (6). Les bovins infectés peuvent être sous-estimés par le dépistage et limiter d'autant la pertinence et l'efficacité des mesures sanitaires de lutte.

Des actions sanitaires peuvent être prises pour limiter la transmission indirecte des bactéries issues de la faune sauvage. La transmission peut être prévenue en limitant leur accès à l'eau et à la nourriture (buvettes et distribution de l'eau du réseau, stockage des aliments en milieu fermé et renouvellement fréquent de leurs distributions). La transmission directe peut être prévenue par la séparation physique des bovins infectés et non infectés. Cependant, cette mesure est, cette fois encore, limitée par la sous-estimation des bovins infectés lors du dépistage préalable.

Les mesures sanitaires ne sont pas pleinement satisfaisantes lorsque l'élevage est infecté. Cependant, elles sont indiquées en l'absence de

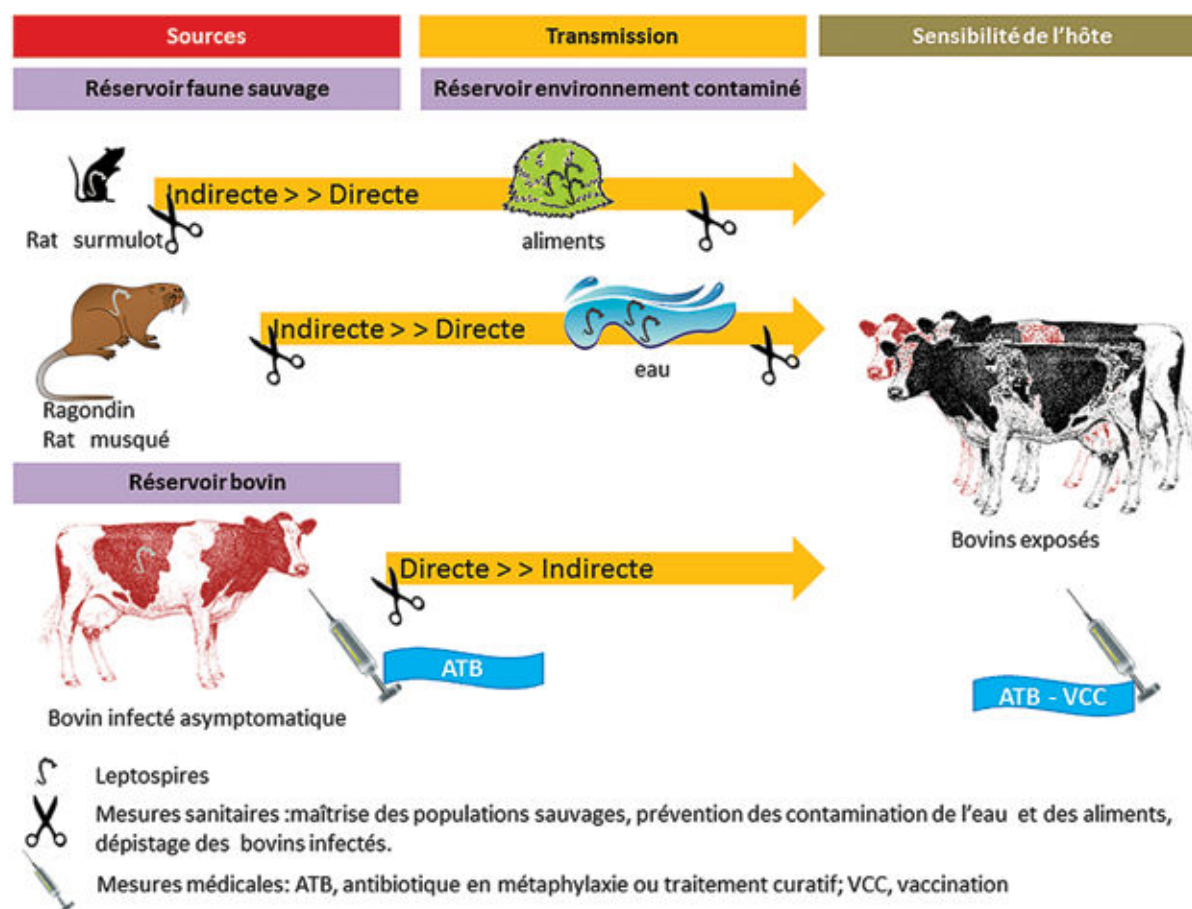


Figure 1.

Synthèse des éléments clefs de la transmission de leptospires pathogènes aux bovins et niveaux d'action pour la lutte contre leur infection.



mesures médicales adéquates ou lorsqu'un élevage sain est exposé à une source d'exposition connue et bien délimitée.

## Mesures médicales

Les mesures médicales ont recours à deux options thérapeutiques, les antibiotiques selon une approche métaphylactique ou curative et le vaccin, selon une approche prophylactique ou visant à assainir le cheptel par diminution de l'excrétion bactérienne des bovins. Les antibiotiques, à l'instar des pénicillines et des tétracyclines pour les plus utilisées en France, ont la même efficacité quel que soit le séro-groupe infectant. Ils diminuent la sévérité des signes cliniques et éliminent, au moins transitoirement, l'excrétion de la bactérie. L'impact sanitaire et économique de l'antibiothérapie ne la rend pertinente qu'en l'absence d'alternatives sanitaires ou médicales. En effet, étant donné que certains bovins infectés ne sont probablement ni détectés par la clinique, ni par le dépistage, l'antibiothérapie doit être appliquée à l'ensemble du troupeau. Si cette option peut être envisagée sur un petit groupe de bovins et dans un contexte épidémiologique particulier (par exemple, des bovins isolés sur une pâture), elle devient économiquement inenvisageable pour la majorité des éleveurs laitiers (coût des traitements et du retrait des productions pendant et après traitements). De plus, l'antibiothérapie n'élimine pas le portage et constitue une option de lutte transitoire, voire partielle. Le recours aux antibiotiques devrait être considéré dans un contexte épidémiologique particulier (petit nombre d'animaux, isolés) ou clinique (infections aiguës et sévères) et devrait être complété par des mesures sanitaires ou la

vaccination si elle est indiquée.

Le vaccin contre la leptospirose bovine, disponible en France depuis 2012, vise la protection contre les leptospires dont le réservoir majeur est le bovin lui-même. En élevage infecté, l'intérêt de la vaccination à court terme (quelques mois) réside dans l'amélioration des performances économiques en diminuant l'impact de l'infection sur la chute brutale de lait et en limitant la baisse de fertilité. À moyen et long termes, la vaccination permet une maîtrise de la contamination du cheptel en diminuant l'excrétion des porteurs et excréteurs apparemment sains. Aucun vaccin visant une protection contre les sérogroupes issus de réservoirs sauvages n'est actuellement disponible en France.

## Évaluation des coûts relatifs aux mesures de lutte

Les mesures de lutte dont les coûts sont évalués, sont ciblées selon leur pertinence. Le dépistage, puis l'élimination ou l'isolement des bovins infectés n'est pas considéré, compte tenu des limites du test pour détecter certains porteurs asymptomatiques. Lors d'exposition du bétail aux infections de la faune sauvage, les mesures sanitaires ne sont pas pleinement efficaces pour limiter l'impact de l'infection mais constituent, souvent, le seul recours. Le coût associé à ces mesures de lutte n'est pas évalué ici, car sa grande variabilité parmi les troupeaux ne permet pas de le généraliser. Ce coût dépend, en effet, des investissements nécessaires pour limiter la présence des espèces sauvages, tels que le type de bâtiment d'élevage (ouvert *versus* fermé) et leur surface, le mode de stockage et de distribution des aliments, le mode de distribution de l'eau et sa qualité.

## Encadré 2. Méthode d'évaluation économique des mesures de lutte

Les mesures de lutte sont conçues pour diminuer les coûts relatifs aux pertes de production dues à la leptospirose. L'avantage du programme de lutte représente la part des pertes réduites par les mesures de lutte. Le bénéfice de la lutte prend en compte à la fois l'avantage de la lutte et le coût de sa mise en place, tel que décrit dans la formule suivante :

$$\begin{array}{c} \text{Gain} \quad \text{Avantage du programme de lutte} \quad + \quad \text{Coût} \quad \text{Programme de lutte} \quad = \quad \text{Bénéfice} \quad \text{Lutte} \\ \hline \geq 0 \quad \quad \quad < 0 \quad \quad \quad \geq 0 \text{ (ou } \leq 0) \end{array}$$

Lorsque  $\text{Bénéfice}_{\text{Lutte}} \leq 0$ , la mesure n'est pas rentable.

## Antibiothérapie

Le coût relatif à l'antibiothérapie n'est considéré que dans le contexte particulier d'un groupe isolé de bovins car en dehors de ce contexte, elle est jugée peu pertinente par les recontaminations possibles et économiquement inenvisageable par la perte de la production laitière totale du troupeau pendant 9 jours (délai de retrait des productions). Le bénéfice attendu après l'antibiothérapie est estimé selon la méthode décrite dans l'Encadré 2 (4). Dans un objectif de simplification des calculs, un effet optimal de 3 avortements évités par l'antibiothérapie est supposé. Un tel avantage de lutte serait éventuellement observé dans un contexte épidémiologique précis impliquant (i) une exposition localisée des bovins par des leptospires issus de la faune sauvage, et (ii) le

transfert des bovins dans un environnement non exposé au moment du traitement, afin d'éviter toute recontamination. Ce scénario suppose, de plus, que l'antibiothérapie induise l'élimination du portage rénal des bovins, ce qui n'est pas rapporté ce jour (7).

Les mesures de lutte sont rentables dans la mesure où  $\text{bénéfice}_{\text{Lutte}} > 0$ , ce qui permet de poser l'expression numérique suivante :

$$\text{Coût}_{\text{Programme de lutte}} < \text{Avantage}_{\text{Lutte}}$$

pour déterminer le nombre de bovins à traiter en deçà duquel la mesure reste rentable (données financières issues du [Tableau 1](#)).

$$\begin{aligned} & 200 \text{ €}_{\text{diagnostic}} \\ + & 121 \text{ €}_{\text{main d'œuvre}} \\ + & 123 \text{ €}_{\text{par vache}} \times n_{\text{vaches}} \\ < & 684 \text{ €}_{\text{par vache avortée}} \times 3 \end{aligned}$$

$$\text{Soit } n < 14_{\text{vaches}}$$

D'après le calcul et dans le contexte décrit, l'antibiothérapie reste rentable pour des troupeaux d'effectif inférieur à 14 bovins. Le recours à l'antibiothérapie est donc économiquement intéressant dans des circonstances limitées.

## Vaccination

Dans les élevages infectés, le protocole vaccinal de 3 injections la première année est recommandé par le fabricant. L'amélioration des performances peut être attendue dans les semaines qui suivent les deux premières injections de vaccin (8). Le coût relatif à la vaccination des cheptels bovins infectés par le sérotype Sejroe peut être évalué selon une approche identique à l'évaluation du coût relatif à l'antibiothérapie.

Dans un objectif de simplification des calculs, un effet optimal de 3 avortements évités par la vaccination est supposé. Afin d'obtenir un

**TABEAU 1. Coûts impliqués par la mise en place d'un programme de lutte fondé sur l'antibiothérapie ou la vaccination, dans un élevage ayant des avortements leptospiroscopiques. Les avantages du programme de lutte font état des coûts relatifs évités (gain) ou en sus (perte) à la suite de la réduction des pertes. Les montants des «avantages par avortement évité» sont issus d'une étude antérieure et le total doit être ajusté au nombre d'avortements évités par le programme de lutte (2).**

Coûts antibiothérapie		Coûts vaccination		Avantages/avortement évité <sup>(f)</sup>	
Diagnostic <sup>(a)</sup>	- 200 €	Diagnostic <sup>(a)</sup>	- 200 €		
Charges en plus		Charges en plus		Produit en moins	
Antibiotique/vache <sup>(b)</sup>	- 22 €	Vaccin/bovin <sup>(c)</sup>	- 3,90 €	Réforme précoce de la vache avortée	- 800 €
Main d'œuvre <sup>(d)</sup>	- 121 €	Main d'œuvre <sup>(d)</sup>	- 60,75 €		
Production en moins				Charges en moins	
Lait (35 L/j, 9 jours) <sup>(e)</sup>	- 101 €			Achat du veau pour remplacer l'avorton	160 €
				Achat de la vache remplacer la vache réformée	1 300 €
				Main-d'œuvre supplémentaire	24 €
Total des coûts		Total des coûts		Total des avantages/avortement évité	
Coût par vache lait	- 123 €	Coût par bovin	- 3,90 €		
Coût fixe par traitement	- 121 €	Coût fixe	- 260,75 €		
Coût fixe	- 200 €				

a. Le coût relatif au diagnostic (frais vétérinaire – déplacement, consultation, prélèvements – et frais d'analyse) est estimé pour 10 bovins <sup>(1)</sup> à environ 200 € (75 € de frais vétérinaire et 125 € de frais d'analyses).

b. Le coût d'un traitement antibiotique est fondé sur deux doses de tétracycline longue action (20 000 UI/10 kg).

c. Le coût du vaccin est estimé à partir de la suggestion du prix de vente dans les centrales d'achat.

d. La main-d'œuvre nécessaire pour administrer le traitement à tout le troupeau. Le temps de travail dépend de l'équipement de l'élevage et du nombre de bovin à vacciner. Il a été évalué à 10 heures <sup>(2)</sup> pour 2 injections d'antibiotique et à 5 heures par séquence d'injection vaccinale pour un cheptel moyen.

e. Les pertes de lait sont fondées sur une production moyenne par vache de 35 L par jour pendant 9 jours (délai de retrait) et estimées à partir du coût de revient du litre de lait <sup>(3)</sup>.

f. Sachant que l'éleveur remplace les animaux malades ou morts.

1. Un prélèvement de 10 % des bovins du cheptel est recommandé par l'OIE pour le diagnostic de la leptospirose.

2. Barèmes du SMIC 2012 : coût de revient pour l'employeur, 12,15 € par heure.

3. Prix du lait : 0,32 €/L, selon l'Office de l'élevage.

bénéfice de lutte positif, l'équation des coûts est formulée comme suit (données financières issues du **Tableau 1**) :

$$\begin{aligned}
 & 200 \text{ €}_{\text{diagnostic}} \\
 + & 60,75 \text{ €}_{\text{main d'œuvre}} \times 3_{\text{injections}} \\
 + & 3,90 \text{ €}_{\text{par bovin}} \times n_{\text{vaches}} \\
 > & 684 \text{ €} \times 3_{\text{avortements}}
 \end{aligned}$$

Soit  $n < 428$ <sub>vaches</sub>

D'après ces résultats, la vaccination est rentable en deçà de 428 bovins vaccinés. Une grande majorité des cheptels bovins en France ont un effectif inférieur à 428 et suggèrent que la vaccination est rentable dans la plupart des cas et dans la limite des conditions imposées pour l'analyse.

## Conclusion

Les mesures de lutte dans les cheptels bovins exposés aux leptospires se distinguent selon le sérotype. Pour des conditions d'efficacité particulière et lors d'exposition au sérotype Sejroe, le plan de lutte le plus rentable est la vaccination de tous les bovins, associée à des

mesures sanitaires si la source de l'infection est identifiée. Lors d'exposition aux autres sérotypes, le plan de lutte requiert une antibiothérapie des bovins associée à des mesures sanitaires si la taille du troupeau est inférieure ou égale à 14 individus ; au-delà de 14 bovins, seules les mesures sanitaires sont économiquement envisageables.

La vaccination est l'alternative de choix en termes d'efficacité à moyen et long terme, mais ne concerne que les infections par les leptospires dont les bovins sont eux-mêmes réservoir (sérotype Sejroe). Des préparations vaccinales multivalentes sont disponibles à l'étranger. Elles sont reconnues pour développer une réponse cellulaire en plus de la réponse humorale et présenteraient potentiellement des protections croisées entre sérotypes (9). Ces alternatives fourniraient dès lors les mesures de lutte adéquates pour circonscrire l'impact de l'infection par les leptospires dans les cheptels bovins en France.

### Remerciements :

Pr. Marc Artois (Unité PERS, VetAgro Sup) et Pr. Angeli Kodjo (Laboratoire des Leptospires – Lyon) pour leurs contributions au contenu de l'article. Ce travail a été fait dans la continuité de l'atelier ECVPH-ECBMH à l'Institut de Santé Publique Vétérinaire – Université de Berne (février 2012) et a été conduit dans le cadre du projet Européen WildTech.

### BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ANDRÉ-FONTAINE G, KODJO A. Leptospirose et troubles de la reproduction chez les bovins. *Bulletin des G.T.V.* 2009, 48: p. 53-58.
- 2 - AYRAL F. La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers: impact économique de l'infection. *Bulletin des G.T.V.* 2013, 69: p. 61-67.
- 3 - BOLIN C.A. Clinical signs, diagnosis and prevention of leptospirosis in cattle. *British Cattle Veterinary Association*, 2001, 9, 267-273.
- 4 - TOMA B., DUFOUR B., BENET J., SANAA M., SHAWA., MOUTOU F. Le coût des maladies. *Épidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales majeures*. 3<sup>rd</sup> ed. p. 344 et p. 537.
- 5 - AYRAL F., BICOUT D., ARTOIS M., KODJO A. Vaccination contre la leptospirose bovine en France: évaluation de l'impact vaccinal à partir de données de laboratoire. *Session des posters, Association pour l'Étude de L'épidémiologie des maladies Animales*, 2003.
- 6 - ANONYME. OIE terrestrial manual 2008, Leptospirosis. Chapitre 2.1.9. p. 251-264.
- 7 - ALT D.P., ZUERNER R.L., BOLIN C.A. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 2001, 5, p. 636-639.
- 8 - VANTEJOU B., MASCARON L. Leptospirose bovine dans un élevage laitier en Normandie: chute de lait, réinfection et vaccination. *Bulletin des GTV*, 2010, 55, p. 75-79.
- 9 - BROWN R.A., BLUMERMAN S., GAY C., BOLIN C.A., DUBYR., BALDWIN C.L. Comparison of three different Leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Vaccine*, 2003, 21, 4448 - 4584.
- 10 - LEVETT P.N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Comparative Infectious Disease*, 2003, 36, p. 447-452.



Annexe 4

Hantavirose à virus Séoul en Europe:  
émergence d'une zoonose chez des rats en Europe

Point Vétérinaire / Juin 2013 / N°336: 14-18

Florence Ayrat



Florence Ayrat

Université de Lyon, VetAgro Sup,  
USC 1233, équipe PERS,  
69280 Marcy-l'Étoile  
Résidente du collège ECVPH

0,05 CFC  
par article lu

ZOONOSES VIRALES

# Hantavirose à virus Séoul : émergence d'une zoonose chez les rats en Europe

L'émergence récente d'Hantavirus Séoul pathogènes pour l'homme au Royaume-Uni appelle à la vigilance en Europe, notamment pour les propriétaires de rats domestiques et les personnes en contact avec les rats sauvages.

Travail conduit dans  
le cadre du projet  
européen WildTech.

## Conflit d'intérêts

Aucun.

## RÉSUMÉ

► Les hantaviruses sont des zoonoses virales dues aux *Hantavirus* (famille des *Bunyaviridae*) dont les manifestations cliniques, potentiellement fatales, concernent en moyenne 200 000 patients chaque année dans le monde. Actuellement, plus de quarante *Hantavirus* sont identifiés, parmi lesquels le virus Séoul (SEOV) associé à la découverte récente de souches pathogènes en Europe (la forme la plus fréquente d'hantavirose en France est due au virus Puumala). Les rats, dont le surmulot (*Rattus norvegicus*), sont les réservoirs du SEOV. Le rat surmulot représente un danger biologique pour l'homme en raison de sa répartition mondiale, de sa synanthropie (vie en relation avec l'espèce humaine), et sa forte propension à porter et à excréter des agents pathogènes zoonotiques et émergents. Cette synthèse présente un point d'actualité sur l'impact et les enjeux en santé publique des infections par les *Hantavirus*, en se focalisant sur l'émergence récente de SEOV pathogène pour l'homme chez les rats sauvages et domestiques en Europe.

Les hantaviruses sont des maladies virales responsables, chez l'homme, de syndromes systémiques pouvant engager le pronostic vital. Ces affections de répartition mondiale sont des zoonoses dont les réservoirs principaux sont des rongeurs. Les agents étiologiques sont les *Hantavirus* (encadré 1). Ils appartiennent à la grande famille des *Bunyaviridae*, qui compte de nombreux virus zoonotiques et qui a vu l'émergence récente de virus majeurs en santé humaine et animale, à l'exemple du virus Schmallenberg chez les ruminants d'Europe en 2011 [5, 15].

En 2012, le premier cas humain d'insuffisance rénale aiguë résultant d'une infection à virus Séoul (SEOV) transmise par des rats sauvages a été décrit

en Europe (encadré 2) [6]. Il a été suivi, quelques mois plus tard, de nouveaux cas d'infection, transmis par des rats de compagnie (encadré 3) [7].

La synthèse des connaissances sur l'évolution des hantaviruses au vu de ces nouveaux cas humains souligne l'impact des *Hantavirus* et, indirectement, des rats en santé publique.

## CARACTÉRISTIQUES DES HANTAVIRUS

### 1. À l'origine d'un panel d'Hantavirus

La famille des *Bunyaviridae*, dont fait partie le genre *Hantavirus*, regroupe des virus enveloppés de petite taille

#### ENCADRÉ 1

### Fièvre hémorragique avec syndrome rénal et syndrome pulmonaire à Hantavirus

Les *Hantavirus* sont à l'origine de deux syndromes distincts : la fièvre hémorragique avec syndrome rénal (FHSR) reconnue en Europe et en Asie, et le syndrome pulmonaire à Hantavirus (SPH) présent sur le continent américain. Les manifestations cliniques de la FHSR sont de gravité variable selon les agents pathogènes en cause.

Les formes les plus sévères sont dues au virus Dobrava (DOBV) en Europe et au virus Hantaan en Asie, alors que la forme bénigne, appelée "néphropathie épidémique", est liée au virus Puumala (PUUV) et correspond aux épidémies à Hantavirus régulièrement enregistrées en France. L'Hantavirus Séoul (SEOV), dont le réservoir est le rat (*Rattus norvegicus* et

*Rattus rattus*), est à l'origine de formes souvent bénignes largement rapportées en Asie [8, 11, 20]. Aucun cas humain (à l'exception de contaminations de laboratoire) n'avait été décrit en Europe avant 2012 et les SEOV identifiés chez le rat étaient, jusqu'alors, réputés peu ou pas pathogènes pour l'homme [4].

ENCADRÉ 2

## Premier cas humain d'hantavirose sévère à SEOV et isolement simultané de ce virus chez des rats sauvages au Royaume-Uni

(de l'ordre d'une centaine de nanomètres). Ces derniers sont caractérisés par un génome d'ARN simple brin trisegmenté. Cette structure en trois segments d'ARN L (*large*), M (*medium*) et S (*small*) favoriserait l'émergence de nouveaux virus par l'échange possible de matériel génétique entre deux virus infectant une même cellule. Ce phénomène de réassortiment du matériel génétique est décrit chez les *Bunyaviridae* avec le virus Shamonda (SHAV), qui serait réassorti (*reassortant* en anglais) du virus Schmallerberg et d'un virus inconnu [3]. Dans ce cas précis, si l'existence de virus réassortis est établie, en revanche, la chronologie reste controversée.

Bien qu'appartenant à une autre famille (*Orthomyxoviridae*), le virus influenza, largement étudié et documenté, peut être cité comme une illustration du phénomène de réassortiment génétique. En effet, le génome viral est constitué de huit segments d'ARN à l'origine de nombreux réassortiments, tel que le virus pandémique H1N1 issu de virus humain, aviaire et porcin. Dans une moindre mesure, les trois segments d'ARN attribuent aux Hantavirus une capacité de réassortiment génétique

En janvier 2012, le Laboratoire des pathogènes rares et importés (*Rare and Imported Pathogen Laboratory*, Royaume-Uni) a détecté un cas suspect d'infection à Hantavirus chez un patient atteint d'une insuffisance rénale aiguë. La technique d'immunofluorescence indirecte a montré la présence d'anticorps spécifiques aux Hantavirus Hantaan et Séoul (SEOV) avec un titre d'IgG supérieur à 1:10 000, en faveur

d'une infection. Le malade était régulièrement exposé à des rats à son domicile (région du Yorkshire et Humber) et avait noté une augmentation de leur population au cours des derniers mois. Pour tester l'hypothèse d'une exposition à l'agent étiologique au contact de ces animaux, un piégeage a été réalisé dans la résidence familiale du patient, dans les semaines qui ont suivi le diagnostic. Le SEOV a été mis en évidence par

RT-PCR (*real time-polymerase chain reaction*), spécifique de l'espèce Séoul grâce à des amorces préalablement publiées [17]. Le virus identifié a été isolé et nommé "Humber", du nom de la localité où le virus a été identifié. La forte présomption d'infection de ce malade par le virus Humber et sa proximité génétique avec d'autres Hantavirus pathogènes font de lui un virus potentiellement pathogène pour l'homme.

et l'émergence potentielle de nouvelles espèces. Désormais, plus de quarante Hantavirus sont décrits, qui sont probablement issus d'un ancêtre commun malgré des évolutions indépendantes sur les continents eurasiens et américains. Bien que cette approche ait été remise en question, les Hantavirus sont habituellement classés en virus de l'Ancien Monde (continent eurasiens) et en virus du Nouveau Monde (continent américain) sur des arguments

phylogénétiques et pathogéniques [2]. En effet, les deux syndromes ont une distribution géographique singulière, les fièvres hémorragiques à syndrome rénal (FHSR) étant observées sur le continent eurasiens et des syndromes pulmonaires à Hantavirus (SPH) sur le continent américain.

## 2. Réservoir animal en Europe

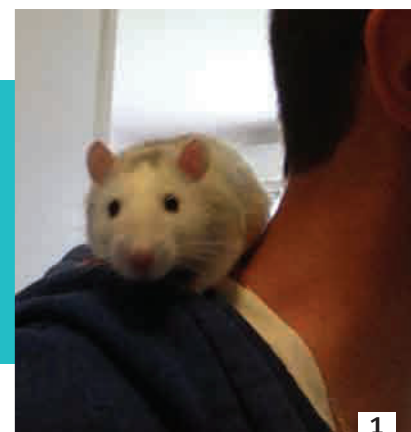
La persistance des Hantavirus et leur transmission à l'homme sont

ENCADRÉ 3

## Premier cas humain d'hantavirose sévère à SEOV et isolement simultané de ce virus chez des rats domestiques au Royaume-Uni

En janvier 2013, une infection à Hantavirus Séoul (SEOV) est diagnostiquée par immunofluorescence indirecte sur sérum paillé chez un patient du Pays de Galles hospitalisé pour une fièvre hémorragique à syndrome rénal (FHSR). Les deux rats de compagnie (*Rattus norvegicus*) de ce dernier étant des sources possibles de la maladie, le virus a été dépisté à partir de prélèvements de sang et d'urine (photo 1). Les résultats de RT-PCR (*real time-polymerase chain reaction*) pour la détection simultanée des virus Hantaan (HTNV) et SEOV étaient positifs [9]. Des extraits d'ARN viral provenant directement du tissu pulmonaire ont été soumis à une caractérisation supplémentaire du virus par le biais du séquençage. La séquence a confirmé que le virus, nommé "Cherwell", était un SEOV similaire (sans être identique)

aux souches précédemment isolées au Royaume-Uni : Humber (rats sauvages) et IR461 (rats de laboratoire) [19]. Les deux rats étaient issus d'un élevage de l'Oxfordshire (Royaume-Uni). Vingt et un rats de l'élevage ont subi un dépistage à partir d'échantillons sanguins. Un tiers des animaux (7/21) avait une RT-PCR positive à HTNV/SEOV dans le sang avec des séquences identiques au virus Cherwell (données préliminaires). Les dépistages du virus chez l'éleveur et son épouse étaient positifs. L'enquête rétrospective des dossiers médicaux a montré que la femme avait été admise à l'hôpital fin 2011 pour une maladie virale non diagnostiquée entraînant une insuffisance rénale. Désormais, il est possible de statuer sur une probable infection à SEOV transmise par les rats de l'élevage.



1. La proximité entre le rat dit "domestique" et son propriétaire est favorable à la transmission d'agents pathogènes zoonotiques.

PHOTO : J. RODRIGUEZ

## Points forts

- Des infections par un Hantavirus de Séoul (SEOV), identifiées en Europe en 2004, ont été décrites pour la première fois au Royaume-Uni chez un homme et des rats sauvages en 2012, et chez un propriétaire de deux rats de compagnie également atteints en 2013. Cette émergence appelle à la vigilance.
- Les formes de maladies à Hantavirus sont majoritairement bénignes et endémiques en Europe, mais sévères sur le continent américain.
- La pluralité des Hantavirus, dont les réservoirs sont les rongeurs, leur prévalence et leur dispersion en font un problème de santé publique dans le monde.
- Le rat de compagnie peut être le réservoir d'agents pathogènes zoonotiques et les acquéreurs devraient être tenus informés des risques auxquels ils s'exposent.

assurées par leur réservoir. Chaque Hantavirus possède son propre réservoir. Ce sont des rongeurs, à l'exception des musaraignes qui sont des insectivores. Les virus étant fragiles dans l'environnement extérieur, leur maintien et leur dissémination sont strictement conditionnés par la présence de l'hôte. Par conséquent, la distribution géographique des Hantavirus est étroitement liée à celle des espèces qui les maintiennent (tableau). En France, trois Hantavirus sont principalement décrits chez des rongeurs : les virus Puumala (PUUV), Tula (TULV) et SEOV [1, 4]. PUUV est répandu en Champagne-Ardenne et son réservoir, le campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*), est incriminé dans les épidémies régulièrement observées dans cette région [13]. La première identification génétique du SEOV issu de rats sauvages en France et plus généralement en Europe a été réalisée en 2004 à partir de rats capturés dans la région Rhône-Alpes

[4]. SEOV a ensuite été isolé chez des rats en Belgique [16]. Auparavant, le SEOV avait été identifié en Europe en laboratoire, mais non chez des rats sauvages. Les SEOV décrits en France et en Belgique sont apparentés aux virus décrits en Asie chez le rat surmulot, ce qui suggère une dissémination de virus asiatiques par des rats [12].

En France, l'identification de SEOV chez des rats, d'une part, et le cas, non publié mais cité, d'un patient atteint de FHSR avec un résultat sérologique positif pour SEOV, d'autre part, suggéraient une probable transmission du rat à l'homme. Le niveau de preuve était toutefois limité par l'approche sérologique et ses possibles réactivités croisées entre les espèces d'Hantavirus.

Au Royaume-Uni, en revanche, la transmission de SEOV par les rats sauvages et domestiques est actuellement avérée [6, 7]. À partir des cas rapportés dans des publications, la

distribution géographique des infections par SEOV chez l'homme ou chez des rats en Europe se limite à la France, à la Belgique et au Royaume-Uni (figure) [4, 6, 7, 14, 16, 21].

## IMPACT DES HANTAVIROSES CHEZ L'HOMME

Bien que tous les virus appartiennent au même genre viral, les deux tableaux cliniques, FHSR, d'une part, et SPH, d'autre part, suggèrent une pathogénie radicalement différente selon les virus impliqués.

### 1. FHSR en Asie et en Europe

La FHSR doit son nom à l'apparition de fièvre avec des hémorragies capillaires, des pétéchies et une défaillance rénale. La sévérité des signes cliniques et la réversibilité des dommages dépendent du virus infectant. Les formes sévères sont généralement associées aux virus Dobrava (DOBV) en Europe et Hantaan (HTNV) en Asie, et rarement au SEOV. Les FHSR associées au SEOV se limitent souvent à un dysfonctionnement hépato-rénal bénin. Lors d'infection au PUUV, ou néphropathie épidémique (NE), la dysfonction rénale est prédominante et les hémorragies sont rares. Le taux de létalité de la FHSR varie d'environ 2 %, lors d'infection à PUUV ou à SEOV, à 12 %, pour les virus DOBV et HTNV.

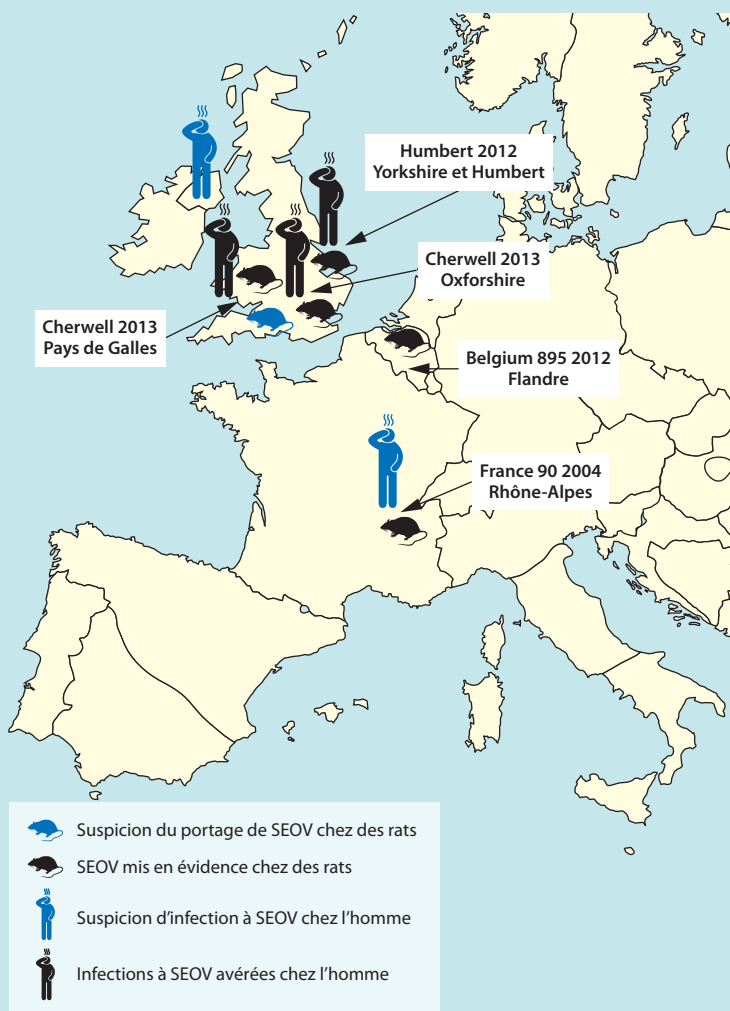
TABLEAU

### Liste des principaux Hantavirus décrits en Europe et leur espèce réservoir associée

VIRUS	FAMILLE DE RÉSERVOIR	ESPÈCES RÉSERVOIRS	NOM COMMUN	LOCALISATIONS
Hantaan	Murinae	<i>Apodemus agrarius</i>	Souris rayée	Chine, Corée, Russie
Dobrava		<i>Apodemus flavicollis</i>	Mulot à collier roux	Balkans
Saaremaa		<i>Apodemus agrarius</i>	Souris rayée	Europe
Séoul		<i>Rattus norvegicus</i>	Rat surmulot	Monde
Amur		<i>Apodemus peninsulae</i>	Souris coréenne des champs	Est de la Russie
Puumala	Arvicolinae	<i>Myodes glareolus</i>	Campagnol roussâtre	Europe
Tula		<i>Microtus arvalis</i>	Campagnol commun	Europe, Russie
Seewis	(non rongeur)	<i>Sorex araneus</i>	Musaraigne commune	Europe
Far East	-	-	-	Est de la Russie

## FIGURE

Distribution des infections à Hantavirus Séoul (SEOV) mises en évidence<sup>(1)</sup> lors de cas humains de FHRS et distribution des SEOV mis en évidence<sup>(2)</sup> chez des rats surmulots



FHRS : fièvre hémorragique à syndrome rénal, SEOV : Hantavirus Séoul.

(1) Par RT-PCR ou sérologie (suspicion en absence de cinétique des anticorps ou en raison de possibles réactions croisées entre virus du genre).

(2) Par RT-PCR ou sérologie.

Initialement décrite au début des années 1950 pendant la guerre de Corée, la FHRS est endémique en Asie et en Europe. Environ 200 000 cas relèvent d'une hospitalisation chaque année dans le monde. En Europe, entre 2005 et 2010, plus de 600 cas ont été rapportés en France, 1 500 en Belgique, 3 500 en Suède, 4 000 en Allemagne et 11 000 en Finlande, essentiellement dus au PUUV. La séroprévalence fluctue le plus souvent entre 1 et 5 % et peut atteindre 24 % dans certaines régions endémiques de Suède et de Finlande. L'appréciation de ces prévalences devrait tenir compte d'une

probable sous-estimation en raison des symptômes non spécifiques et de l'absence de tests diagnostiques normalisés dans les hôpitaux.

Dans la forme clinique bénigne (NE), seuls 30 % des cas seraient confirmés par un diagnostic de laboratoire et enregistrés.

Les récentes publications faisant état de FHRS sévères au Royaume-Uni associées au SEOV sont les premières de ce type en Europe de l'Ouest. Une vigilance accrue est désormais nécessaire pour évaluer s'il s'agit de cas exceptionnels ou de la réelle émergence de SEOV pathogènes pour l'homme en Europe [6, 7].

## 2. SPH sur le continent américain

Le SPH est reconnue comme une entité clinique depuis 1993 et concerne le continent américain. Il correspond généralement à la forme la plus sévère des hantaviroses. Celle-ci se manifeste le plus souvent par une fièvre et un œdème pulmonaire évoluant jusqu'au décès dans 40 % des cas. Avec 200 cas par an à travers le continent américain, les SPH sont peu nombreux. Cependant, cette maladie a un fort impact sur la santé publique en raison de son taux de létalité élevé.

## ÉPIDÉMIOLOGIE ET PRÉVENTION

### 1. Risque d'exposition aux Hantavirus

Les Hantavirus étant étroitement liés à leur réservoir, les facteurs de risque des maladies sont principalement écologiques. La modification des écosystèmes a un effet sur le risque de transmission à l'homme. En particulier, l'augmentation des populations de rongeurs est associée à celle des cas humains.

L'homme s'infecte par contact avec les excréta et sécréta infectieux (féces, urine, salive), essentiellement sous forme d'aérosols ou, dans une moindre mesure, par morsure [10]. Les personnes qui ont une relative proximité avec les animaux réservoirs (forestiers, chasseurs, habitants de zones colonisées par les rongeurs) sont à risque d'hantavirose. L'exemple de l'épidémie récente chez des campeurs ayant fréquenté le parc national du Yosemite aux États-Unis illustre les risques encourus par les personnes mises en contact avec des excréta infectieux [18]. Certaines épidémies en milieu rural ont lieu en automne et en hiver lors de la colonisation des maisons par les rongeurs, à la différence des épidémies urbaines qui sont, le plus souvent, associées à une contamination alimentaire par les excréta infectés.

### 2. Mesures de contrôle

En raison des données épidémiologiques, la prévention des hantaviroses repose sur des mesures usuelles d'hygiène et de limitation des populations de rongeurs (raticide, capture,



Hantavirose à virus Séoul :  
émergence d'une zoonose  
chez les rats en Europe

**2. L'homme s'infecte par contact avec les fèces, l'urine ou la salive, généralement sous forme d'aérosols ou, plus rarement, par morsure.**

PHOTO : J. RODRIGUEZ



2

diminution des accès). Des précautions particulières (port d'un masque, de lunettes, de gants) devraient être prises par les personnes particulièrement exposées, lors de contact étroit avec les rongeurs, ou dans un milieu confiné et colonisé par ces animaux. La découverte de SEOV chez des rats domestiques, en plus des rats sauvages, représente un défi supplémentaire pour le contrôle de l'infection chez l'homme (photo 2). En effet, le rat est une espèce synanthrope et sa proximité avec l'homme accroît le risque de transmission des Hantavirus. L'ensemble des faits et des investigations britanniques rapportés souligne l'intérêt de sensibiliser les services sanitaires en France pour tenter de prévenir de telles zoonoses. Les salons de vente de nouveaux animaux de compagnie favorisent les contacts et la dissémination d'agents pathogènes par des animaux potentiellement porteurs. Pour déterminer le risque de transmission à l'homme, des études de prévalence du virus chez les rats domestiques et sauvages sont nécessaires. Leur résultat permettrait d'évaluer la pertinence et la nature de contrôles sanitaires réguliers dans les élevages et les lieux de vente.

#### REMERCIEMENTS

Aux professeurs Marc Artois et Michel Pépin (VetAgro Sup – Unité Pathogènes Émergents et Rongeurs Sauvages) et à Philippe Marianneau (Anses Laboratoire de Lyon, unité de virologie) pour leur contribution au contenu de l'article, et Jonathan Rodriguez (étudiant vétérinaire) pour la mise à disposition des photos.

#### Conclusion

Depuis des siècles, et bien avant la connaissance de leur impact en santé publique, l'homme tente d'éradiquer les rats, concurrents alimentaires et destructeurs d'habitat. Ces animaux sont particulièrement bien adaptés aux méthodes de lutte : l'organisation des populations, la néophobie et l'apparition de gènes de résistance aux rodenticides leur permettent de rester omniprésents. De plus, ils sont adaptés au portage asymptomatique d'agents pathogènes, qui peuvent être zoonotiques et émergents, et qui font que les rats représentent un risque sanitaire important pour l'homme.

La transmission de zoonoses par les rats domestiques défraie régulièrement la chronique : hantavirose (Royaume-Uni, 2013), virose due au virus cowpox (France et Allemagne, 2009), salmonellose (États-Unis, 2007), leptospirose (États-Unis, 2008). Le rat domestique n'est pas un animal de compagnie comme les autres : il reste un rat sauvage dit "domestique" par le mode de vie qui lui est imposé et un réservoir d'agents pathogènes. Les acquéreurs de ces nouveaux animaux de compagnie devraient être tenus informés des risques zoonotiques auxquels ils s'exposent. ■

## Summary

### Seoul Hantavirus virus: emergence of a zoonosis in rats in Europe

► The Hantaviruses are viral zoonoses caused by Hantavirus (family Bunyaviridae) whose clinical manifestations, which are potentially fatal, concern an average of 200 000 patients each year worldwide. Currently, more than forty Hantavirus are identified, including the Seoul virus (SEOV) associated with the recent discovery of pathogenic strains in Europe (the most common form of hantavirus in France is due to Puumala virus). In rats, Norway or brown rats (*Rattus norvegicus*) are reservoirs of SEOV. The brown rat is a biological hazard to humans because of its global distribution, its synanthropy (the animal lives in association with the human species), and its propensity to carry and excrete zoonotic and emerging pathogens. This summary presents an update on the impact and public health issues affected by Hantavirus infection, focusing on the recent emergence of SEOV pathogenic to humans in wild and domestic rats in Europe.

#### Keywords

Seoul Hantavirus, Norway rat, brown rat, common rat, health risk, haemorrhagic fever, renal syndrome.

## Références

- Artois M, Cochez C, Van Mele R et coll. Genetic evidence of Puumala and Tula Hantaviruses in rodents in the Jura region, France - Preliminary results. *Eur. Surveill.* 2007;12(26):28.
- Clement J, Maes P, Lagrou K et coll. A unifying hypothesis and a single name for a complex globally emerging infection: Hantavirus disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011;19(1):126-128.
- Goller KV, Hoper D, Schirmmeier H et coll. Schmallenberg virus as possible ancestor of Shamonda virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2012;18:1644-1646.
- Heyman P, Plyusnina A, Berry P et coll. Seoul Hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004;23(9):711-717.
- Hoffmann B, Scheuch M, Höper D et coll. Novel orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2012;18(3):469-472.
- Jameson LJ, Logue CH, Atkinson B et coll. The continued emergence of Hantaviruses: isolation of a Seoul virus implicated in human disease, United Kingdom, October 2012. *Eur. Surveill.* 2013;18(11):4-7.
- Jameson LJ, Taori SK, Atkinson B et coll. Pet rats as a source of Hantavirus in England and Wales. *Eur. Surveill.* 2013;18(9):28.
- Kim YS, Ahn C, Han JS et coll. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by the Seoul virus. *Nephron.* 1995;71(4):419-427.
- Kramski M, Meisel H, Klempa B et coll. Detection and typing of human pathogenic Hantaviruses by real-time reverse transcription-PCR and pyrosequencing. *Clin. Chem.* 2007;53(11):1899-1905.
- Krüger DH, Schönnrich G, Klempa B. Human pathogenic Hantaviruses and prevention of infection. *Hum. Vaccin.* 2011;7(6):685-693.
- Lee HW, Baek LJ, Johnson KM. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J. Infect. Dis.* 1982;146(5):638-644.
- Lin XD, Guo WP, Wang W et coll. Migration of Norway rats resulted in the worldwide distribution of Seoul Hantavirus today. *J. Virol.* 2012;86:972-981.
- Mailles A, Vaillant V, Haeghebaert S et coll. Recrudescence des infections à Hantavirus, France 2003. *Méd. Maladies Infect.* 2005;35(2):68-72.
- McKenna P, Clement J, Matthys P et coll. Serological evidence of Hantavirus disease in Northern Ireland. *J. Med. Virol.* 1994;43(1):33-38.
- Pépin M, Laaberk MH, Dupinay T et coll. De l'importance croissante des *Bunyaviridae* en santé publique et vétérinaire, illustrée avec les Hantavirus et les virus de Schmallenberg et de la fièvre de la vallée du Rift. *Bull. Acad. Vét. (France).* 2012;165 (sous presse).
- Plyusnina A, Heyman P, Baert K et coll. Genetic characterization of Seoul Hantavirus originated from Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured in Belgium. *J. Med. Virol.* 2012;84(8):1298-1303.
- Puthavathana P, Lee HW, Kang CY. Typing of Hantaviruses from five continents by polymerase chain reaction. *Virus Res.* 1992;26(1):1-14.
- Roehr B. US officials warn 39 countries about risk of Hantavirus among travellers to Yosemite. *BMJ.* 2012;10:345.
- Shi X, McCaughey C, Elliott RM. Genetic characterisation of a Hantavirus isolated from a laboratory-acquired infection. *J. Med. Virol.* 2003;71(1):105-109.
- Zhang YZ, Zou Y, Fu ZF et coll. Hantavirus infections in humans and animals. *China Emerg. Infect. Dis.* 2010;16:1195-1203.
- Webster JP, McDonald DW. Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Parasitology.* 1995;111(3):247-255.

## Annexe 5

PCR detection and analyzis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats.

Viol J. 2014; 11(1):90.

Widén F, Ayrat F, Artois M, Olofson AS, Lin J

SHORT REPORT

Open Access

# PCR detection and analysis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats

Frederik Widén<sup>1\*</sup>, Florence Ayrat<sup>2</sup>, Marc Artois<sup>2</sup>, Ann-Sophie Olofson<sup>1</sup> and Jay Lin<sup>1,3</sup>

## Abstract

**Background:** Hepatitis E virus has been detected in a wide range of animals. While Genotypes 1-2 of this virus infect only humans, 3-4 can spread from animals to humans and cause sporadic cases of human disease. Pig, and possibly also rats, may act as a reservoir for virus. From a public health perspective it is important to clarify the role of rats for infection of humans. Rats often live close to humans and are therefore of special interest to public health. Rats live of waste and inside the sewage system and may become infected. Reports of hepatitis E virus in rats have been published but not from France. The possibility that rats in an urban area in France were Hepatitis E virus infected, with which type and relationship to other strains was investigated. This study provides information important to public health and better understanding the occurrence of hepatitis E virus in the environment.

Eighty one rats (*Rattus Norvegicus*) were captured, euthanized, sampled (liver and faeces) and analyzed by real-time RT-PCR's, one specific for Hepatitis E virus in rats and one specific for genotype 1-4 that that is known to infect humans. Positive samples were analyzed by a nested broad spectrum RT-PCR, sequenced and compared with sequences in Genbank.

**Findings:** Twelve liver and 11 faeces samples out of 81 liver and 81 faeces samples from 81 captured rats were positive in the PCR specific for Hepatitis E virus in rats and none in the PCR specific for genotype 1-4. Comparison by nucleotide BLAST showed a maximum of 87% similarity to Hepatitis E virus previously detected in rats and significantly less to genotype 1-4.

**Conclusions:** This is the first study demonstrating that rats in France carries hepatitis E virus and provide information regarding its relation to other virus strains previously detected in rats and other host animals world-wide. Genotype 1-4 was not detected.

**Keywords:** Hepatitis E, Rat, Zoonoses, PCR

## Background

It has been estimated that wildlife is responsible for 72% of emergent infectious diseases in humans [1,2]. In order to limit the spill over of zoonotic agents, improved wildlife pathogen surveillance is required. It is also necessary to gain better insight into viral factors for species specificity. This is true also for Hepatitis E virus (HEV) a pathogen that is present in wildlife, domestic animals and humans [3,4]. In developing countries, it causes large scale disease outbreaks in humans as well as endemic infections related to poor sanitary conditions. In countries with good sanitary standards the disease in humans, Hepatitis E,

occurs sporadically. Such infections are either acquired during travelling to endemic areas or from a domestic source in the infected person's home country [3,4]. Wild-boars or pigs may constitute such a reservoir [3,4] but other species can also play a role. HEV infecting humans only or humans and other mammals are taxonomically divided in four genotypes [5]. While the large scale epidemics and endemic infections in third world countries as well as cases imported from these countries are caused by hepatitis E of genotype 1 or 2, infecting humans only, the domestically acquired infections in industrialized countries are caused by genotype 3 in Europe and North America or 4 in East Asia. It is widely believed that pigs and wild boars constitute a reservoir for genotype 3 or 4 for human infections and humans may acquire these infections through consumption of undercooked pig, wild

\* Correspondence: [Frederik.widen@sva.se](mailto:Frederik.widen@sva.se)

<sup>1</sup>Department of Virology, Immunobiology and Parasitology, The National Veterinary Institute (SVA), 751 89 Uppsala, Sweden

Full list of author information is available at the end of the article



boar or deer meat. In France the prevalence of anti-HEV antibodies in the general population was determined to be 3.2%, a figure similar to other industrialized countries [6]. A survey performed on French pig farms demonstrated a 65% prevalence of anti-HEV antibodies [7]. Another survey on wild boar demonstrated a prevalence of anti-HEV antibodies between 7.2 and 22.7% in different geographical regions [8]. No figures for Lyon were available but the highest value came from Aveyron that is relatively close to Lyon. The transmission of HEV between different animal species has not yet been clarified. Furthermore it is not known what determines the pathogenicity and the host range. The current taxonomy is based on a study by Lu et al. [5] but has been challenged and additional genotypes have been proposed [9]. HEV has been detected in several species like for example pig, wild boar, deer, moose, rabbit, ferret, mink, rat, poultry and cutthroat trout [3,4,10-15]. HEV from pig and wild boar belong to genotype 3 or 4 and are related. HEV from deer belong to genotype 3 [4] and HEV from rabbits is closely related to genotype 3 [9] while HEV from moose does not belong to genotype 1-4 [10]. Avian HEV share only 50% nucleotide identity with genotype 1-4 and cutthroat trout HEV is very distantly related to the others [14,15]. Rats can be infected with seemingly rat specific HEV or with genotype 3 [13,16]. The zoonotic potential of rat specific HEV is controversial [17,18]. Serological investigations have suggested that humans may be infected by rat specific HEV [19]. It is likely that genotype 1-4 infecting rats can also infect humans. Because *R. norvegicus* is a synanthropic species, humans and rats live in close proximity. Rats are well known to transmit pathogens to humans and other animals. Their high prevalence and propensity to carry pathogens make them a potential reservoir for human pathogens including HEV. Indeed, according to previous surveys, antibodies against HEV are highly prevalent in rats [17] and HEV RNA has been detected in rats (*R. norvegicus* and other rat species) in Germany, USA, Vietnam, Denmark, China and Indonesia [13,16,20-23]. Differentiation of rat specific HEV from HEV genotype 3 by serology has been published [19] but is not generally available. Most HEV strains found in rats were of the rat specific type but genotype 3 RNA has also been detected in rats [16]. It is therefore important to further clarify the role rats may have as a reservoir for human HEV infections. The objectives of this study were to investigate if HEV could be detected in French rats in an urban environment, to determine the type HEV that was present in order to better judge the risk for zoonotic infections and finally to determine the relationship to other previously detected HEV strains in order to create a more complete picture of HEV infecting rats.

The study was part of a survey of infectious agents in wild rats (*Rattus Norvegicus*) conducted in the city of

Lyon in Center-East France as part of the EU-funded Wildtech project. As a part of this survey, liver and faeces samples from rats were collected and analyzed for presence and characterization of HEV strains.

## Results and discussion

### TaqMan® assay specific for HEV from rat

Eighty-one rats of the species *Rattus Norvegicus* were caught. No other rat species were observed. Twelve of eighty-one (15%) liver samples were positive in real-time RT-PCR amplifying HEV from rat [17]. The rats were labeled "Rat HEV Ly Id number 2012" and the rats with PCR positive liver samples had Id numbers 839, 848, 867, 873, 874, 877, 879, 880, 882, 883, 888, 894. Testing of eighty-one faeces samples resulted in eleven positive samples. The positive faeces samples came from rats that also had positive liver samples. All positive samples came from rats caught in the low income area. Nine (75%) adult male and 3 (25%) adult female rats were positive in this PCR. No positive juvenile rats were found.

The sex ratio of the positive rats can be explained by the fact that 74% of the rats collected in this area were males. Similarly the age ratio of the positive rats (100% adults) can be explained by the clear dominance of adults (88%) among the collected rats.

### Prevalence and confidence interval of HEV specific for rats

Fifteen percent ( $p = 12/81$ ) of the rat tested for HEV had a PCR-positive result. Then the 95% confidence interval for the prevalence was  $IC_{95\%} = [7\% - 22\%]$ .

### TaqMan® assay specific for genotype 1-4 of HEV

All liver and faecal samples tested by a real-time PCR specific for genotype 1-4 [24] were found to be negative in this assay.

### Nested PCR of real-time RT-PCR positive samples

All samples positive by real-time RT-PCR for HEV from rat were positive when amplified with this nested PCR [25].

### Sequence analysis

Assembly of sequences (DNASTAR Lasergene 8) and subsequent BLAST analysis confirmed that the sequences represented HEV and were similar to other HEV sequences recovered from rats.

The sequences from the twelve rats displayed highly similar sequences. Only one nucleotide position displayed synonymous substitution. The HEV strain from rats 874, 883 and 894 had a "C" at position 4192, as compared to the HEV sequence from rat, rat/Mu/0685/DEU2010, accession number JN167537.1. Rat 877 had a wobble base that varied between "C" and "T" (R) at this position while the other sequences had a "T" at position 4192 in the cDNA sequence. The multiple sequences deduced from

each individual rat sample confirmed this single silent mutation. The high level of similarity between these sequences can be explained by the fact that all HEV positive rats were captured at the same location. Nucleic acid BLAST analyses against HEV sequences at NCBI gave a maximum identity of 87%, for the entire (100%) amplicon sequence, as compared to the German HEV strain rat/Mu09/0685/DEU/2010 followed by identities between 80% and 86% for other strains from German, American, Chinese and Vietnamese rats. The strain detected in Vietnam (HEV strain Vietnam-105, accession number JX120573.1), had 82% identity. Two strains from USA displayed an identity of 84% (HEV rat/USA/2003, accession number JF516246.1) and 83% (Hepatitis E virus isolate MVZ201020, accession number JQ898482.1). Several Chinese strains displayed identities of 83%. Although the difference to other strains from rat, by nucleotide sequence BLAST was 12%-20%, the difference by protein BLAST was very small (Maximum 98% identity, HEV strain KS12/1305, Denmark, accession number AGH06684). The high similarity between rat HEV strains is also evident in the amino acid alignment (Figure 1). All strains from rats collected in this study are 100% identical in the amino acid alignment and they differ by a few amino acids only when compared to other rat HEV strains. However when compared to genotype 1-4 the difference is significantly larger and largest when compared with avian HEV.

The phylogenetic tree (Figure 2) confirmed that the HEV strains detected in this study are most related to other Rat specific HEV strains but cluster separately from other rat HEV strains. They are most related to Rat HEV strains detected in Germany (Figure 2) while the strain detected in Vietnam is more distant.

HEV of genotype 3 has previously been detected in rats [14]. These samples were also tested for genotype 1-4 with an assay that is regarded as highly sensitive. Because the rats were negative for genotype 3 and positive for rat related HEV only, they do not pose an evident risk for zoonotic HEV infections of humans. The HEV detected in these rats is related to other HEV strains from rats. The difference compared to HEV genotype 3 is considerably larger at the protein level (maximum 74% identity) while the similarity is higher when compared with HEV from ferrets (maximum 86% identity). The phylogenetic comparison (Figure 2) confirms that detected HEV sequences clusters together with other strains from rats and is not so distant from the HEV strain from ferret [10]. However, the detected strains do not cluster closely with genotype 1-4. On the contrary, genotype 1-4 is clustering on a branch that is separated from the branch containing rat and ferret HEV strains. While it has been clearly demonstrated that genotype 1-4 certainly poses a risk for human infections there is also a group of mammalian HEV strains that do not belong to genotype 1-4. The number of strains in

this group has been expanding rapidly as an increasing number of species have been screened for HEV. While some strains like Avian HEV and HEV in cutthroat are only distantly related to HEV infecting mammals, there are a number of HEV strains that are more similar to genotype 1-4 but still sufficiently different not to be included in any of these genotypes, like for example rat and ferret HEV. These strains are currently not regarded as zoonotic. However, further studies of determinants of strain specificity, pathogenicity and the relationship between different mammalian HEV strains may shed more light on the zoonotic capability of HEV.

## Methods

### Collection of samples from rats (*Rattus Norvegicus*)

Rats provided for this study were trapped for the purpose of pest control (trapping agreement n°691810). They were captured, euthanized and sampled following the relevant ethical and safety rules (animal research agreement n° 69-020931). The procedure was supervised by the ethical committee of the VetAgro Sup and European regulation (EU Directive 86/609).

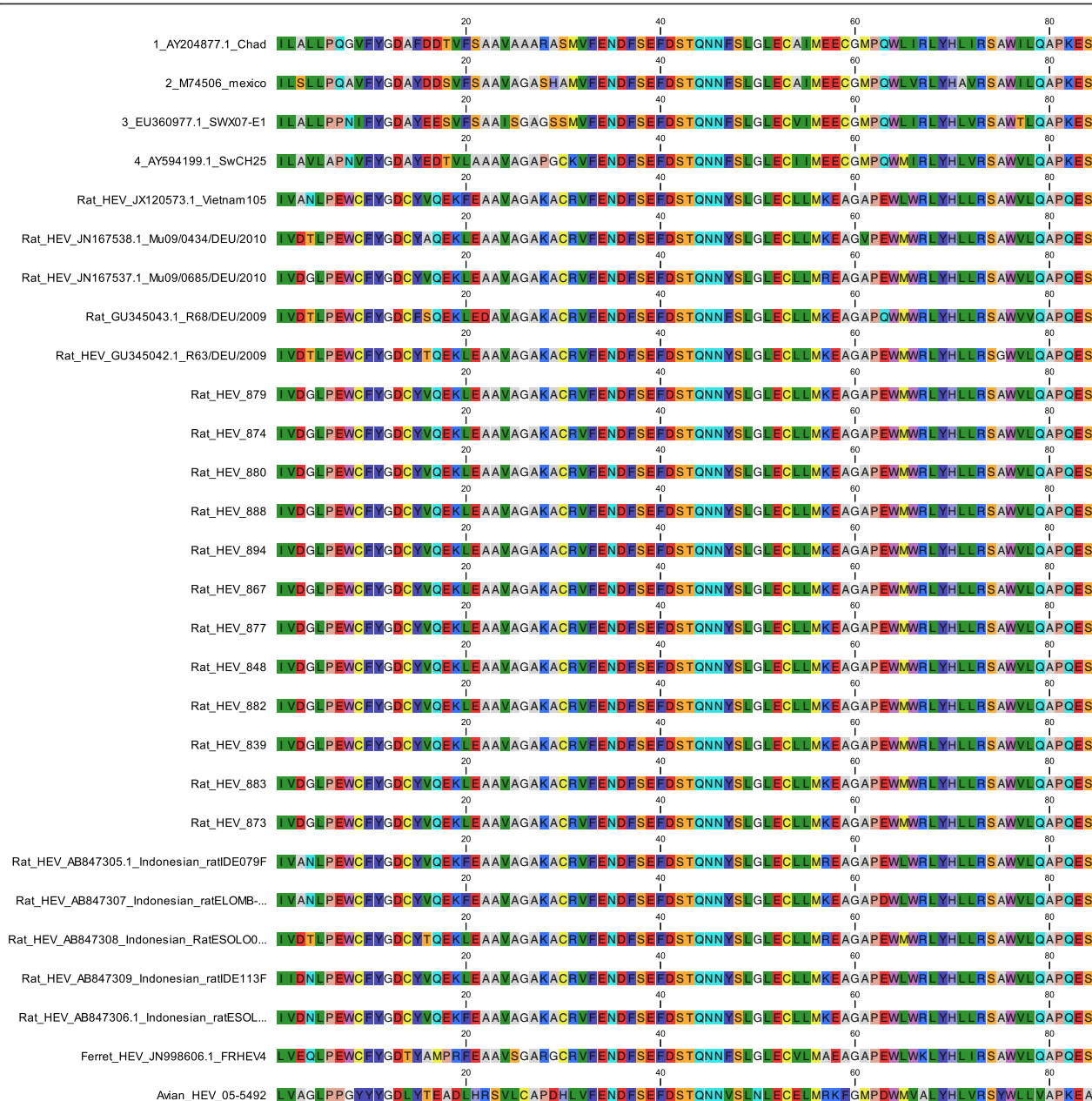
The necessary sampling size ( $n \approx 90$ ) was calculated using 95% confidence level, a relative accuracy of 50% and 10%-30% expected prevalence.

The survey was conducted in selected areas of Lyon during a six month period from October 2011 to March 2012. The trapping sites were chosen for their abundance of rats, as reported by the Hygiene Service of the city and their environmental differences relevant for the risk investigations. A peri-urban area, a low income area, a public garden, a waste treatment plant (WTP) and a waste water treatment plant (WWTP), were the five trapping areas.

The low income area comprised of 619 apartments which were distributed on 0.6 km<sup>2</sup> and the traps were set in 20% ( $n = 127$ ) of the dwellings. The public garden was situated in the city centre and featured a large pond and captive wildlife. In the industrial area, the trapping was performed in a WTP and a WWTP. The trapping success was 42, 8, 23, 7 and 1 captured Norway rats in the low income area, the public garden, the WTP, the peri-urban area and the WWTP plant, respectively. A total of 81 (56 male and 25 female) rats were captured and screened by HEV PCR. Of these 54 were adults (as defined by a weight over 100 gram and having sexually mature organs) and 27 juvenile. The captured rats were labelled "Rat HEV Ly Id number 2012".

### Trapping and sampling of rats

All rats were captured in small (28 cm × 9 cm × 9 cm) or large (50 cm × 15 cm × 15 cm) single catch rat traps. The traps were placed on the paths of rats as described by people familiar with the area (visitors, employees, inhabitants). The distance between each trap depended



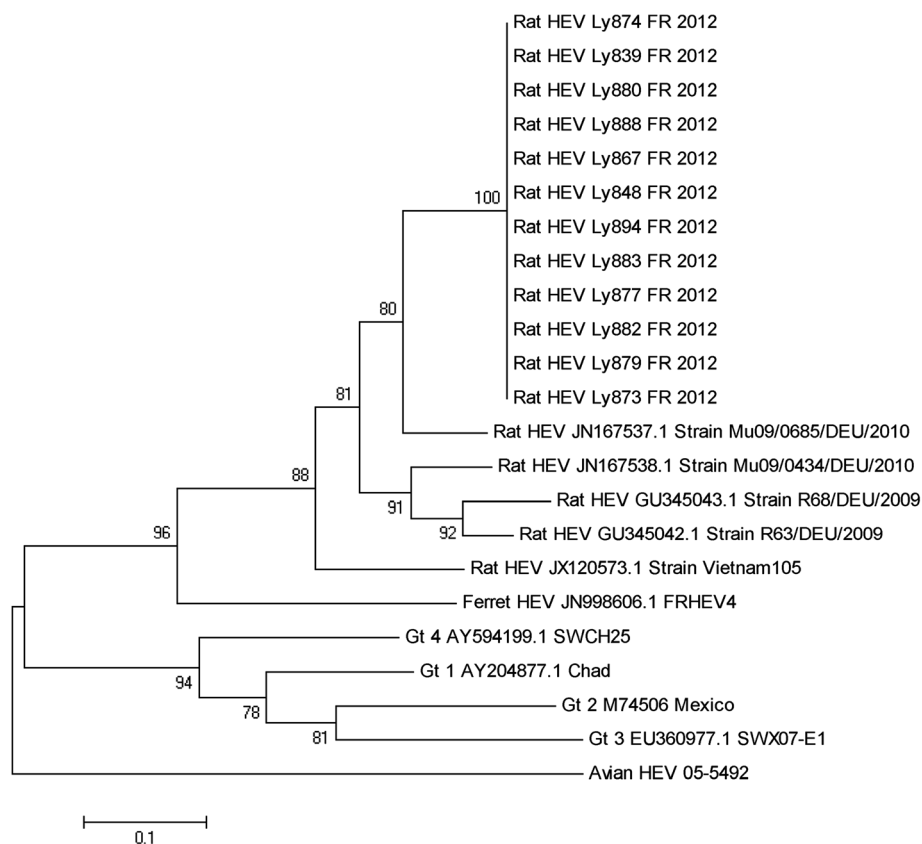
**Figure 1 Multiple sequence alignment of deduced amino acid sequences from nucleotide sequences used for phylogeny (Figure 2).**  
The multiple alignment was constructed using MEGA5. It corresponds to the same fragment used for phylogeny (Figure 2).

on the area to be covered and varied from 1 to 5 m. Traps were baited with peanut butter and set at locations around the clock for the trapping period. The rats were collected each morning. Captured rats were transported in the traps to the laboratory, placed inside fume hoods and immediately anesthetized using isofluran and euthanized by cervical dislocation. The species, weight, sex and approximate age (juvenile vs adults) of each rat was determined by ocular inspection of morphology and weighing. Eighty-one rats were aseptically dissected and two liver samples of 30 mg each and two faeces

samples were collected (from the rectum). The samples were immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to shipping to SVA in Sweden.

### Extraction of RNA

Eighty-one livers samples and 81 faeces samples from 81 rats were analyzed. The liver samples were cut and the fresh surfaces were sampled using a cotton swab which was subsequently soaked in 850  $\mu\text{l}$  TE-buffer. The faeces samples were diluted 1:4 in TE-buffer. RNA was extracted from 90  $\mu\text{l}$  liver sample suspension using a magnatrix



**Figure 2** Phylogenetic tree depicting the relation between the HEV sequences from French rats to a selection of other HEV sequences.

Phylogenetic tree of sequences corresponding to a 254 nt long fragment from the nested PCR product of the amplified RdRp fragment. The sequence corresponds to nucleotide position 4127 to 4371 of the rat HEV strain rat/Mu/0685/DEU2010, accession number JN167537.1. The tree was constructed by the Neighbor joining method using MEGA 5.05. The tree is depicting the relationship of the French HEV strains from 12 rats, here called "Rat HEV Ly, sample number, and Fr 2012" and described in this article, with selected HEV sequences from rat, ferret, avian HEV and genotype 1-4. The bar indicates the evolutionary distance as number of base substitutions per site. The bootstrap consensus was generated using 1000 replicates. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates were collapsed. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test is shown. The tree is drawn to scale. The evolutionary distances were computed using the Tamura-Nei method (number of base substitutions per site). The rate variation among sites was modeled with a gamma distribution (shape parameter = 6). All positions containing gaps and missing data were eliminated.

(Magnetic Biosolutions Sweden) or from 50 µl faeces samples suspension using a MagMax (King Fisher) Robot.

#### Reverse transcription of RNA and PCR amplification of HEV RNA in rat samples

Eighty-one liver and faeces samples (one from each from each rat) were tested by PCR as specified below.

#### TaqMan® assay specific for HEV from rat

Extracted RNA, including positive control R68, was analyzed by Taq Man real-time RT-PCR specific for HEV from rat, on a Corbett Rotorgene 3000 instrument, as previously described [17] but modified according to the recommended cycling parameters given in the instructions for the Agpath rRT PCR kit (Life technologies, USA) and with modified reverse primer (rHEV-R2) and probe (rHEV-P2) sequence as recommended by Dr. R. Johne

(personal communication) to avoid false negative results. The PCR target the region 5214-5286 in the rat/Mu/0685/DEU2010 sequence. Briefly; the forward primer rHEV-F (5'-TACCCGATGCCGGGCAGT-3'), the reverse primer rHEV-R2 (5'-ATCYACATCWGGGACAGG-3') and the probe rHEV-P2 (5'-AATGACAGCACAGGCACCGGC GCC-3') labelled with 6-FAM at the 5' end and Black hole quencher (BHQ) at the 3' end was used. The total reaction volume was 25 µl per tube including 4.6 µl of added template. After reverse transcription for 10 min. at 50°C and inactivation for 15 min. at 95°C, 55 cycles consisting of 15 sec. at 95°C and 60 sec. at 60°C was performed. Fluorescence was collected during the annealing step.

#### TaqMan® assay specific for genotype 1-4 of HEV

Subsequently, all liver and faecal samples, including positive control Swe 8, were analyzed by a PCR assays



specific for genotype 1-4 as previously described [24] with modifications (see below). The PCR target approximately position 5060 to 5126 in the rat/Mu/0685/DEU2010 and position 5293 to 5362 in the SwX07-E1 sequence. Briefly, the forward primer JHEVF (5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'), the reverse primer JHEVR (5'-AGGGGTGGTTGGATGAA-3') and the probe JHEVP (5'-CCGACAGAATTGATTTCGTCGGC-3') labelled with Cy5 at the 5' end and Black hole quencher 2 (BHQ2) at the 3' end was used. The total reaction volume was 12.5 µl per tube including 3 µl added template. The Agpath rRT PCR kit was used for the RT-PCR and the RT-PCR program was identical with the RT-PCR program specific for HEV from rat.

#### **Nested PCR of real-time RT-PCR positive samples**

The twelve samples positive by real-time RT-PCR specific for rat HEV were amplified with a previously described nested PCR targeting a fragment of the RNA dependent RNA polymerase (RdRp) in ORF1 [25]. Briefly, extracted RNA was used as template for a one-step RT-PCR (Qiagen, Germany). Primers HEV-cs (5'-TCGCGCATCACMTTYT TCCARAA-3') and HEV-cas (5'-GCCATGTTCCAGACD GTRTTCCA-3') were used for the RT-PCR while the modified primer HEV-csn mod (5'-TGTTGCCCTGTT TGGCCCCTGGTTTAG-3') and the primer HEV-casn (5'-CCAGGCTCACCRGARTGYTTCTTCCA-3') were used for the nested step. For the nested PCR, the Platinum Taq (Life Technologies) was used. For the one-step RT-PCR the reactions were held at 50°C for 30 min., and at 95°C for 15 min. followed by 40 cycles of 94°C for 30 sec., 50°C for 30 sec. and 72°C for 45 sec. followed by final extension at 72°C for 10 min.. For the nested PCR the reactions were activated at 94°C for 30 sec. followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec., 50°C for 30 sec. and 72°C for 45 sec. followed by final extension at 72°C for 10 min.

#### **Estimation of prevalence**

The estimated prevalence ( $\hat{p}$ ) in the rat population within the sampled area here called "the low income area", in Lyon, was the proportion of positive samples. The approximate 95% confidence interval ( $IC_{95\%}$ ) of the true prevalence was given by  $IC_{95\%} = p \pm 1.96 * \sqrt{\frac{pq}{n}}$  with "p" the proportion of PCR-positive rats, "q" the proportion of PCR-negative rats and "n" the sample size.

#### **Sequencing of HEV positive samples**

The 12 samples successfully amplified by nested PCR were sequenced from different PCR products on average 4-5 times per product using the inner primers from the nested PCR. The sequencing was performed at an Applied Biosystem 3130xl.

#### **Sequence analysis**

Multiple alignments of sequences were performed using DNA-STAR Lasergene 8 and a 254 nt fragment was selected for further analysis. This fragment was chosen because it was the largest that had good sequence coverage for all 12 rat samples. Consensus sequences for individual rat samples were created with DNASTAR Lasergene 8. These consensus sequences were analyzed using the nucleotide BLAST program at NCBI as well as by Mega 5.05.

Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA version 5.05. The phylogenetic tree was deduced using Neighbour joining with Tamura 3 parameter and gamma parameter 0.3. Bootstrap analysis was performed with 1000 repeats.

#### **Ethical statement**

Information regarding approval by an ethics committee is given in the manuscript. Rats provided were trapped for the purpose of pest control (agreement n°691810) and captured, euthanized and sampled following the ethical rules (agreement n° 69-020931) supervised by the ethical committee of the VetAgro Sup and European regulation (EU Directive 86/609).

#### **Competing interests**

The authors declared that they have no competing interests.

#### **Authors' contributions**

FW planned and carried out the molecular genetic studies and drafted the manuscript. FA planned the study, took part in sample collection, provided the samples for molecular analysis and took part in drafting the manuscript. MA conceived and planned the study and corrected the manuscript. ASO planned and performed molecular analysis and corrected the manuscript. JL performed sequence alignments, designed and performed phylogenetic analysis and helped with drafting of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### **Acknowledgements**

The authors like to thank Dr. Reimar Johnen for providing the positive PCR control and updated primer and probe sequences. The study was financially supported by the Wildtech project (EU 7th Framework Program for Research and Technological Development, grant agreement no. 222633) and by the Swedish Research Council Formas, project number 2009-6527-14916-76.

#### **Author details**

<sup>1</sup>Department of Virology, Immunobiology and Parasitology, The National Veterinary Institute (SVA), 751 89 Uppsala, Sweden. <sup>2</sup>VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy L'Etoile, France. <sup>3</sup>Department of Biomedical Science and Veterinary Public Health, The Swedish University of Agriculture, 750 07 Uppsala, Sweden.

Received: 20 January 2014 Accepted: 29 April 2014

Published: 15 May 2014

#### **References**

1. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH: Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001, **356**:991–999.
2. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P: Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008, **451**:990–993.
3. Purcell RH, Emerson SU: Hidden danger: the raw facts about hepatitis E virus. *J Infect Dis* 2010, **202**:819–821.

4. Arends JE, Ghisetti V, Irving W, Dalton HR, Izopet J, Hoepelman AIM, Salmon D: **Hepatitis E: an emerging infection in high income countries.** *J Clin Virol* 2014, **59**:81–88.
5. Lu L, Li C, Hagedorn CH: **Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis.** *Rev Med Virol* 2006, **16**:5–36.
6. Boutrouille A, Bakkali-Kassimi L, Crucière C, Pavio N: **Prevalence of Anti-Hepatitis E Virus antibodies in French blood donors.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**:2009–2010.
7. Rose N, Lunazzi A, Dorenlor V, Merbah T, Eono F, Eloit M, Madec F, Pavio N: **High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011, **34**:419–427.
8. Payne A, Rossi S, Lacour SA, Vallée I, Garin-Bastuji B, Simon G, Hervé S, Pavio N, Richomme C, Dunoyer C, Bronner A, Hars J: **Bilan sanitaire du sanglier vis-à-vis de la trichinellose, de la maladie d'Aujeszky, de la brucellose, de l'hépatite E et des virus influenza porcins en France.** *Bulletin Epidemiologique Santé Animal – Alimentation* 2011, **44**:2–8.
9. Smith DB, Purdy MA, Simmonds P: **Genetic variability and the classification of hepatitis E virus.** *J Virol* 2013, **87**:4161–4169.
10. Lin J, Norder H, Uhlhorn H, Belák S, Widén F: **Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose.** *J Gen Virol* 2014, **95**:557–570.
11. Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, Lhomme S, Marchandeau S, Boucher S, Kamar N, Abravanel F, Guérin JL: **Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18**:1274–1281.
12. Raj VS, Smits SL, Pas SD, Provacia LBV, Moorman-Roest H, Osterhaus ADME, Haagmans BL: **Novel Hepatitis E Virus in Ferrets, the Netherlands.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18**:1369–1370.
13. John R, Heckel G, Plenge-Bonig A, Kindler E, Maresch C, Reetz J, Schielke A, Ulrich RG: **Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:1452–1455.
14. Huang FF, Sun ZF, Emerson SU, Purcell RH, Shivaprasad HL, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ: **Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV.** *J Gen Virol* 2004, **85**:1609–1618.
15. Batts W, Yun S, Hedrick R, Winton J: **A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*).** *Virus Res* 2011, **158**:116–123.
16. Lack JB, Volk K, Van Den Bussche RA: **Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18**:1268–1273.
17. John R, Dremsek P, Kindler E, Schielke A, Plenge-Bonig A, Gregersen H, Wessels U, Schmidt K, Rietschel W, Groschup MH, Guenther S, Heckel G, Ulrich RG: **Rat hepatitis E virus: Geographical clustering within Germany and serological detection in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*).** *Infect Genet Evol: J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2012, **12**:947–956.
18. Cossaboom CM, Córdoba L, Sanford BJ, Piñeyro P, Kenney SP, Dryman BA, Wang Y, Meng XJ: **Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States.** *J Gen Virol* 2012, **93**:1687–1695.
19. Dremsek P, Wenzel JJ, John R, Ziller M, Hofmann J, Groschup MH, Werdermann S, Mohn U, Dorn S, Motz M, Mertens M, Jilg W, Ulrich RG: **Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs.** *Med Microbiol Immunol* 2012, **201**:189–200.
20. Li TC, Ami Y, Suzuki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Takaji W: **Characterization of full genome of rat hepatitis E virus strain from Vietnam.** *Emerg Infect Dis* 2013, **19**:115–118.
21. Wolf S, Reetz J, John R, Heiberg AC, Petri S, Kanig H, Ulrich RG: **The simultaneous occurrence of human norovirus and hepatitis E virus in a Norway rat (*Rattus norvegicus*).** *Arch Virol* 2013, **158**:1575–1578.
22. Li W, Guan D, Su J, Takeda N, Wakita T, Li TC, Ke CW: **High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China.** *Vet Microbiol* 2013, **165**:275–280.
23. Mulyanto, Suparyatmo JB, Andayani IG, Khalid, Takahashi M, Ohnishi H, Jirintai S, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H: **Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis.** *Virus Res* 2014, **179**:102–112.
24. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR: **A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus.** *J Virol Methods* 2006, **131**:65–71.
25. John R, Plenge-Bönig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A: **Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR.** *J Gen Virol* 2010, **91**:750–758.

doi:10.1186/1743-422X-11-90

**Cite this article as:** Widén et al.: PCR detection and analysis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats. *Virology Journal* 2014 **11**:90.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



## Annexe 6

Detection and genetic characterization of Seoul Virus  
from commensal brown rats in France.

Virology J. 2014, 11:32.

Dupinay T, Pounder KC, Ayral F, Laaberki MH, Marston DA, Lacôte S,  
Rey C, Barbet F, Voller K, Nazaret N, Artois M, Marianneau P, Lachuer J,  
Fooks AR, Pépin M, Legras-Lachuer C, McElhinney LM.

RESEARCH

Open Access

# Detection and genetic characterization of Seoul Virus from commensal brown rats in France

Tatiana Dupinay<sup>1†</sup>, Kieran C Pounder<sup>2†</sup>, Florence Ayrat<sup>1</sup>, Maria-Halima Laaberki<sup>1</sup>, Denise A Marston<sup>3</sup>, Sandra Lacôte<sup>4</sup>, Catherine Rey<sup>5</sup>, Fabienne Barbet<sup>5</sup>, Katja Voller<sup>3</sup>, Nicolas Nazaret<sup>5</sup>, Marc Artois<sup>1</sup>, Philippe Marianneau<sup>4</sup>, Joel Lachuer<sup>5</sup>, Anthony R Fooks<sup>3,6</sup>, Michel Pépin<sup>1\*</sup>, Catherine Legras-Lachuer<sup>5</sup> and Lorraine M McElhinney<sup>3,6\*</sup>

## Abstract

**Background:** Hantaviruses are single-stranded RNA viruses, which are transmitted to humans primarily via inhalation of aerosolised virus in contaminated rodent urine and faeces. Whilst infected reservoir hosts are asymptomatic, human infections can lead to two clinical manifestations, haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS), with varying degrees of clinical severity. The incidence of rodent and human cases of Seoul virus (SEOV) in Europe has been considered to be low, and speculated to be driven by the sporadic introduction of infected brown rats (*Rattus norvegicus*) via ports.

**Methods:** Between October 2010 and March 2012, 128 brown rats were caught at sites across the Lyon region in France.

**Results:** SEOV RNA was detected in the lungs of 14% (95% CI 8.01 – 20.11) of brown rats tested using a nested pan-hantavirus RT-PCR (polymerase gene). Phylogenetic analysis supports the inclusion of the Lyon SEOV within Lineage 7 with SEOV strains originating from SE Asia and the previously reported French & Belgian SEOV strains. Sequence data obtained from the recent human SEOV case (Replonges) was most similar to that obtained from one brown rat trapped in a public park in Lyon city centre. We obtained significantly improved recovery of virus genome sequence directly from SEOV infected lung material using a simple viral enrichment approach and NGS technology.

**Conclusions:** The detection of SEOV in two wild caught brown rats in the UK and the multiple detection of SEOV infected brown rats in the Lyon region of France, suggests that SEOV is circulating in European brown rats. Under-reporting and difficulties in identifying the hantaviruses associated with HFRS may mask the public health impact of SEOV in Europe.

**Keywords:** Hantavirus, SEOV, France, Brown rat, *Rattus norvegicus*, Next generation sequencing, Viral enrichment

## Introduction

Hantaviruses (family *Bunyaviridae*, genus *Hantavirus*) are single-stranded RNA viruses. Unlike other members of the *Bunyaviridae*, hantaviruses are not transmitted by

arthropods but primarily by rodents of the families *Cricetidae* and *Muridae*, although insectivore and bat hosts have also been reported [1,2]. Each hantavirus appears to be adapted and largely restricted to an individual reservoir host species, implying that they have co-evolved, although phylogenetic analyses suggests that this apparent co-evolution may be more attributed to recent preferential host switching and local adaptation [3].

Transmission to humans is primarily via inhalation of aerosolised virus in contaminated rodent urine and faeces. Whilst infected reservoir hosts are asymptomatic, human infections can lead to two clinical manifestations,

\* Correspondence: michel.pepin@vetagro-sup.fr;  
Lorraine.McElhinney@ahvla.gsi.gov.uk

†Equal contributors

<sup>1</sup> Université de Lyon, VetAgro Sup, USC 1233/Equipe « Pathogènes émergents et rongeurs sauvages (PERS), F-69280 Marcy-L'Etoile, France

<sup>3</sup> Wildlife Zoonoses and Vector-borne Diseases Research Group, Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA), New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, UK

Full list of author information is available at the end of the article



haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and hantavirus cardiopulmonary syndrome (HCPS), with varying degrees of morbidity and mortality [4]. Surveillance in Europe has detected six rodent-borne hantaviruses; Dobrava-Belgrade virus (DOBV), Saaremaa virus (SAAV), Seoul virus (SEOV), Puumala virus (PUUV), Tatenale virus (TATV) and Tula virus (TULV) plus two insectivore-borne hantaviruses; Seewis virus (SWSV) and Nova virus (NVAV) [4-7]. The relative geographic distribution of each hantavirus is defined by their reservoir host [7]. The most common and widespread hantavirus across northern, central and eastern Europe is PUUV, which is associated with the mildest form of HFRS [4].

Unlike other hantaviruses, SEOV has a global distribution due to the worldwide dispersal of its carrier host (*Rattus sp.*). Confirmed human SEOV infections have been reported in Asia (Japan [8], South Korea [9], China [10,11]) and the Americas (USA [12], Brazil [13]). Norwegian/brown rats (*Rattus norvegicus*) are a cosmopolitan species and represent an emerging and widely distributed host of hantavirus in China, where, a total of 1,557,622 cases of HFRS were reported in humans between 1950–2007 with 46,427 deaths (3%) [11,14]. Historically, the presence of Seoul virus in Europe was considered anecdotal and speculated to be driven by the sporadic introduction of infected brown rats via ports [4]. Previously, a single HFRS case near the port city of Lyon, France, had only been confirmed serologically by SEOV FRNT [15] and SEOV antibodies had been reported in brown rats in France (10-78.9%) and Belgium (27.1%) [15,16]. However, more recently the virus has been isolated from wild brown rats in the UK [17] and pet rats in the UK and Sweden [18-20]. In addition, SEOV associated HFRS has been reported in four cases in the UK and France, all of which were clinically severe and involved renal impairment [17,21,22].

This study aimed to determine the presence of SEOV in wild rats (*R. norvegicus*) trapped in and around Lyon, France and analyse any resulting molecular epidemiological data. The study also determined the optimal approach to obtaining SEOV genomic sequence data directly from infected lung tissue by comparing different sample preparation techniques and next generation sequencing (NGS) platforms.

## Results and discussion

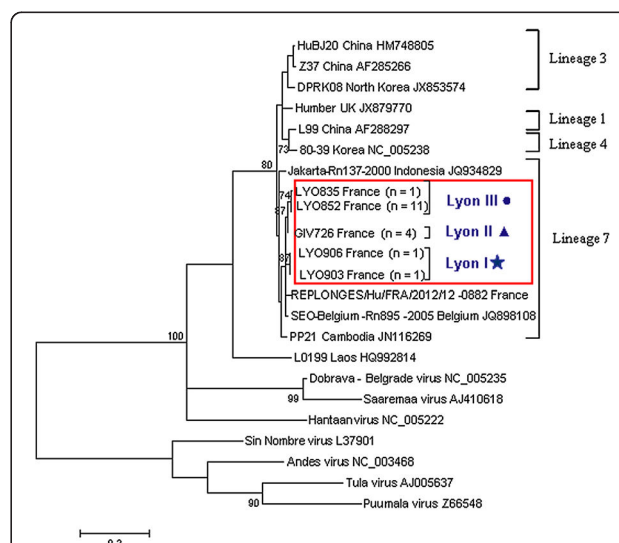
### Detection of SEOV virus

A total of 128 brown rats were caught from 23 sites in and around Lyon. Seoul hantavirus RNA was detected in 14% (18/128) of the rat lung samples tested in triplicate (95% CI 8.01 – 20.11). Positive rats were detected in 6 out of the 23 sites of capture (see Additional file 1).

There was a male bias of 2:1 in the infected individuals: 11 adult males, one juvenile male, one pregnant female and five adult females. The proportion of all males infected was larger than females, 16.4% and 11.3% respectively, but this was not significant (Pearson's Chi-squared test,  $\chi^2 = 0.6568$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.4177$ ).

A male biased ratio amongst SEOV infected rats is not uncommon, and has been reported on several occasions [23-25]. Whilst neither male nor female rats are believed to be more susceptible to Seoul virus infection, males do shed the virus for a longer duration in their urine, faeces and saliva [25] and so the viral RNA may be detectable for longer in the host tissues. In addition, the primary route of transmission between adult males is thought to be through wounds [26], so it has been suggested that the likelihood of males acquiring the Seoul virus is greater due to them having more aggressive encounters [25].

All 18 RT-PCR positive rats were selected for genetic analysis and partial sequences of the L segment (317 bp) were recovered. Eight variable sites were located within this partial sequence. Phylogenetic analysis resolved the Lyon SEOV into three clusters (Lyon I, II and III; Figure 1, Additional file 1) reflecting their disparate trapping locations. The Lyon I, II and III variants were



**Figure 1** Maximum likelihood tree using the model T92 + Gamma [28] for SEOV partial L segment sequences  $n = 23$  in MEGA5 [35]. The trees are drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. Only bootstrap support of >70% are shown. Positions with less than 95% site coverage were eliminated. There were a total of 317 positions in the final dataset. The phylogenetic positions of groups Lyon I, II and III are shown in relation to representative Seoul strains (identical sequences removed for clarity). GIV726 partial L sequence was identical to GIV733, GIV737 and GIV757 (Lyon II). LYO852 partial L sequence was identical to LYO799, 837, 838, 839, 843, 845, 848, 853, 884 and 871 (Lyon III). Genbank accession numbers are shown next to taxa names.

detected at 1 ( $n = 2$  rats), 2 ( $n = 4$  rats) and 3 ( $n = 12$ ) locations respectively (See Additional file 2A). No co-circulation of variants was observed. Lyon I and II were geographically restricted, whereas Lyon III was the most frequently detected and widespread of the variants (Additional file 1). All Lyon SEOV partial L sequences, including that derived from the recent human case (Replonges) showed highest identity to the Belgium SEO/Belgium/Rn895/2005 strain (JQ898108). Lyon I partial L sequences (LYO903 and LYO906) were more divergent from the other Lyon sequences (0.5-1.4%), but they were the closest Lyon SEOV to the nearby severe HFRS case in Replonges (~97.8%) [21]. All 18 RT-PCR L sequences clustered with previously described Lineage 7 sequences within Phylogroup A [14,27], with moderate bootstrap support. Despite their disparate isolation, most SEOV variants published to date are genetically homogenous [11,14] making it difficult to determine the source of introduction. However, at a local level the higher degree of sequence homology can result in geographical clustering as observed in China [14], the UK [18] and for the Lyon SEOV in this study. To further study the molecular epidemiology of a Lyon SEOV strain in the context of global SEOV, we obtained full genome sequence of a representative sample. The strong and non-degraded SEOV positive lung tissue sample LYO852 was chosen as it represented the most frequent and widespread variant detected (Lyon III).

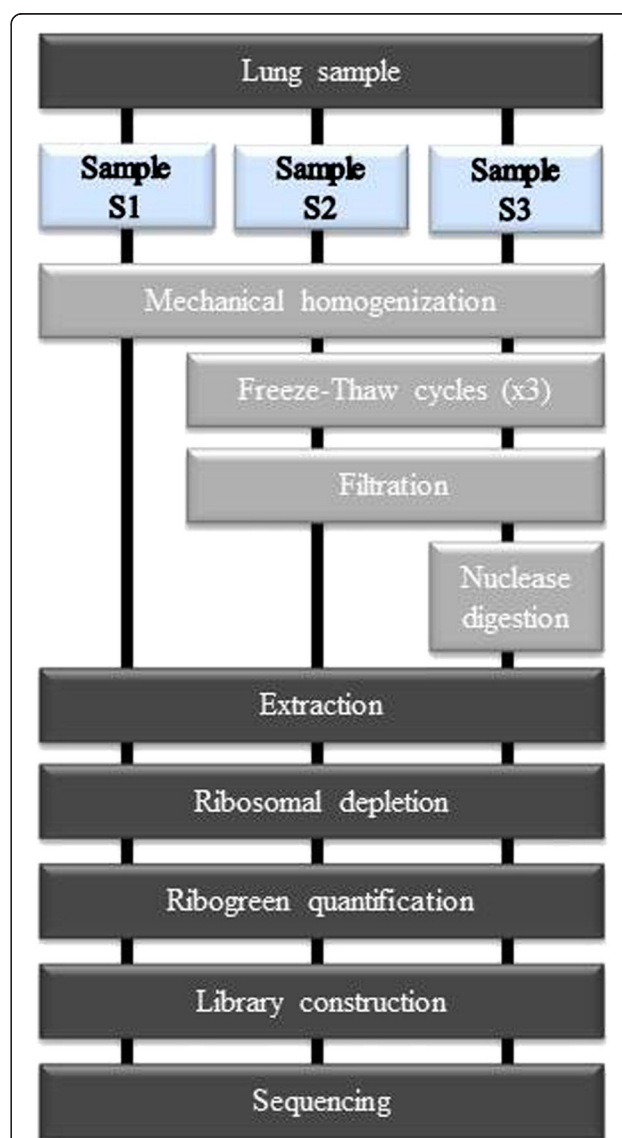
Due to the low abundance of viral sequences relative to total host nucleic acids, we optimised the procedure to obtain complete SEOV genome using two next generation sequencing platforms and differing sample preparation approaches.

#### Roche 454 output and assembly statistics

Viral specific reads from LYO852 were obtained directly from lung tissue on the Roche 454 NGS platform without the use of viral enrichment or ultra centrifugation. *De Novo* assembly of the 454 reads yielded 59 contigs (consisting of 73,105 reads, totalling 24,730,464 bp) representing 82% total reads, with a mean length of 702 bp (ranging between 105-2920 bp). There were 15 contigs  $\geq 500$  bp. Based on BLAST identity searches, all contigs were host or mycoplasma sequences. Mapping of the reads using GS Reference Mapper (Roche) with published SEOV genome sequences identified 44 (0.03%) SEOV specific reads yielding 9 contigs in total for LYO852. Two partial nucleocapsid (S) gene contigs were retrieved of 715 and 786 bp. Three partial glycoprotein (M) gene contigs were retrieved of 612, 987 and 1,735 bp. Four partial polymerase (L) gene contigs were retrieved, of 459, 603, 740 and 1,564 bp. Following alignment, the total 454 coverage for each of the three segments of LYO852 was 84.8% (S), 91.3% (M) and 51.5% (L).

#### Viral enrichment methodology

To improve upon the genome coverage obtained using the Roche-454 platform, we compared several purification procedures and employed the Illumina NGS platform (Figure 2). We combined the homogenization step with or without freeze-thaw cycles, with or without sample filtration (to remove cells and mitochondria), and with or without either of 2 nuclease digestion protocols (to degrade DNA and RNA host contaminants) (data not shown). We observed that the nuclease digestion for



**Figure 2 Workflow for the preparation of lungs tissue samples for next generation sequencing.** All samples were extracted using RNeasy mini kit (Qiagen) and treated by ScriptSeq complete golg kit (Epicentre) and submitted to Illumina sequencing. Comparison of viral enrichment methods: no enrichment procedure was performed for the S1 condition, a filtration step was included for S2 condition and a filtration step with nuclease digestion were combined for the condition S3.

90 min was not sufficient to remove all rRNA and therefore we performed a ribosomal depletion. We compared the various approaches using qPCR assays for GAPDH,  $\beta$ -actin cDNA and viral RNA (data not shown) in comparison to the non-enriched sample (S1). The two optimal enrichment protocols involved homogenisation of the tissue with a micropestle in cold HBSS followed by dry ice freeze thaw cycles and a centrifugation/filtration step, without (S2) or with a subsequent 2 step-digestion (S3) (Figure 2). The 3 resultant samples (S1, S2 and S3) were then used to carry out next-generation sequencing using the Illumina platform.

### Illumina outputs and assembly statistics

Without viral enrichment (S1), 513 Illumina contigs were generated for a total length of 189,884 bp. There were 31 contigs  $\geq 1000$  bp. Of all the contigs, 13 corresponded to SEOV genome (0.34%).

Illumina sequencing for each of the three samples generated between 62 and 91 million sequence reads but 17% to 29% of the reads were discarded after quality filtering (Table 1). As shown in Table 1, the sample S1 presented a larger number of reads that aligned with the reference rat genome sequence (88%) than for the virus enriched samples S2 and S3 (approximately 71 and 47% respectively). Notably, the viral reads were 6 times more abundant in the S3 sample (2.20%) in comparison to the S1 sample (0.34%). Furthermore, the S3 sample appeared more enriched in SEOV reads than the two other samples (Table 1) and that obtained using the Roche 454 platform. Mapping sequence reads revealed complete or near complete ( $>99\%$ ) coverage of the SEOV reference genomes for the virally enriched samples (S3). Complete SEOV genome sequences were recovered from the LY0852 sample and the SEOV consensus sequences of the three samples were identical. The SEOV sequences have been deposited in GenBank under accession numbers KF387723 to KF387725. Hence, we report the significantly improved chances of successfully obtaining complete viral genome sequences by NGS following simple viral enrichment steps. The S3 enrichment approach will be assessed for future NGS analysis on the Roche-454 platform.

### Genetic and phylogenetic analysis

We report the complete genomic sequence of a SEOV strain isolated from *R. norvegicus* in France.

The S-segment has a total of 1755nt with a deduced coding sequence of 1290nt. The putative encoded nucleoprotein (N) (AGZ59811) is 429 amino acids for a predicted 48KDa protein. The S-segment complete coding sequence shared the highest identity (98%) with the complete coding sequences of Vietnamese strains [29,30], the two Singaporean strains Rn41 and Rn46 [31], the SEOV Belgian Rn895 strain and the French Replonges strain [21] (respective GenBank accession numbers: AB618112 to AB618126, GQ274944 and GQ274945, JQ898106 and KC902522). All these strains originated from wild *R. norvegicus* but the Replonges strain was obtained from a patient. The putative N protein was identical to the deduced N protein of strains that originated from South Korea, China, Vietnam, the United Kingdom and the French Replonges strain (NP\_942556, ADE34611, BAL46798, AGB05597 and AGL45258 respectively). It is identical to the 91 amino acid long partial sequence of the France 90 strain (CAI47594), implying that the 2 substitutions at the nucleotide level were silent. It also presents 99.76% nucleotide identity and 100% amino acid similarity with the complete coding region of Belgium/Rn895 strain (AFN11574).

The M-segment sequence (3638nt long) has a deduced coding sequence of 3402nt encoding for a putative polyprotein of 125KDa (AGZ59810). This putative protein precursor presented the conserved cleavage site (WAASA) that is required to give rise to the Gn and Gc membrane glycoproteins [32]. The full M-segment sequence shared, at the nucleotide and protein levels, the highest identity with the strains originating from Vietnam and Singapore. The putative polyprotein is identical to the predicted partial protein sequence of the France90 strain (CAI47595) confirming that the 3 substitutions are silent. It also presents 6 substitutions (5 of which are synonymous substitutions) when compared with the sequence of the Belgium/Rn895 strain (JQ898107, AFN11575).

The L-segment sequence obtained is 6511nt long. The deduced coding sequence (6456nt) encodes the putative

**Table 1 Overview of the sequence reads and mapped SEOV sequences obtained using the Illumina NGS platform for sample preparations S1-S3**

Illumina Sample Prep	Read data							Reads from SEOV Segments			Reads from SEOV	% reads from SEOV
	Total reads	PF	PF aligned	% PF aligned	% Ribosomal	Viral reads	% viral reads	Segment S	Segment M	Segment L		
S1	91,661,298	75,522,658	66,580,460	88.16%	0.99%	255,911	0.34%	12,675	30,211	13,617	56,503	22%
S2	83,920,361	59,434,134	42,659,876	71.78%	30.95%	434,756	0.73%	10,610	37,111	43,345	91,066	20.90%
S3	62,479,875	46,105,731	21,974,935	47.66%	21.55%	1,016,600	2.20%	112,152	363,008	381,521	856,681	84.29%

PF: Pass Filter (Quality Check). PF Aligned – sequences aligned with rat genome (see methods).



RNA-dependent RNA polymerase (AGZ59809) whose size is predicted at 246KDa. When compared exclusively to full length coding sequences, the LY0852 strain shared the highest identity with the L-segment of the China Z37 strain (96%). However, when considering partial sequences, it presented the highest identity (99%) with the Belgium/Rn895 strain partial L-segment sequence (JQ898108).

From the 3 reconstructed phylogenetic trees (Figure 3), the LY0852 strain is resolved in the SEOV clade within the South East Asian virus lineage, also referred to as lineage 7 [27,33]. According to the nucleotide and protein analysis and the phylogenetic reconstruction of the full length S-segment, the LY0852 strain shared the most evolutionary relatedness with the strains previously detected either in Belgium (Belgium/Rn895) or in France (Replonges strain). Altogether, these findings are consistent with the earlier genetic description of the Belgium/Rn895 strain [33]. It supports further the hypothesis of a SEOV introduction in Europe due to the migration of its carrier, the brown rat, during trade between China and Europe [14]. However, the Lyon SEOV (LY0852) strain is clearly distinct from the strains isolated in the United Kingdom (IR461, Humber and Banbury strains) which appear to represent a distinct lineage. As the Replonges strain had been detected in a patient, our results raise concerns regarding the circulation of the SEOV virus in the Lyon area. Unfortunately, the wider distribution of SEOV in France is currently unknown. In particular, SEOV prevalence should be investigated in other large cities such as Marseille or Paris where commensal rodent populations are significant.

We report the presence of multiple foci of SEOV infected wild brown rats trapped in disparate locations in and around the large French city of Lyon. The recent detection of SEOV in wild brown rats in the UK [17] and pet rats in the UK and Sweden [18-20] may suggest SEOV emergence. However, there has been limited surveillance for hantaviral RNA in brown rats in Europe. It is likely that future surveillance will identify similar foci of infection in *R. Norvegicus* in other European countries. The contribution of SEOV to European HFRS cases should be further investigated to estimate the public health impact posed by commensal brown rats.

## Materials and methods

### Sample collection

Between October 2010 and March 2012, 128 brown rats (*Rattus norvegicus*) were trapped in and around the city of Lyon, France. Rats were trapped using small (28 cm × 9 cm × 9 cm) or large (50 cm × 15 cm × 15 cm) single catch rat traps. Captured rats were transported to the laboratory where live rats were immediately anaesthetised using Isoflurane and sacrificed by cervical dislocation.

Each rat was aseptically dissected. Lung tissues were collected from different lobes.

Rats provided for this study were trapped for the purpose of pest control (agreement no. 69-1810). They were euthanized and used (agreement no. 69-020931) according to ethical rules supervised by the ethical committee of VetAgroSup and European regulation (Directive EU 86/609).

### Screening for Hantavirus RNA

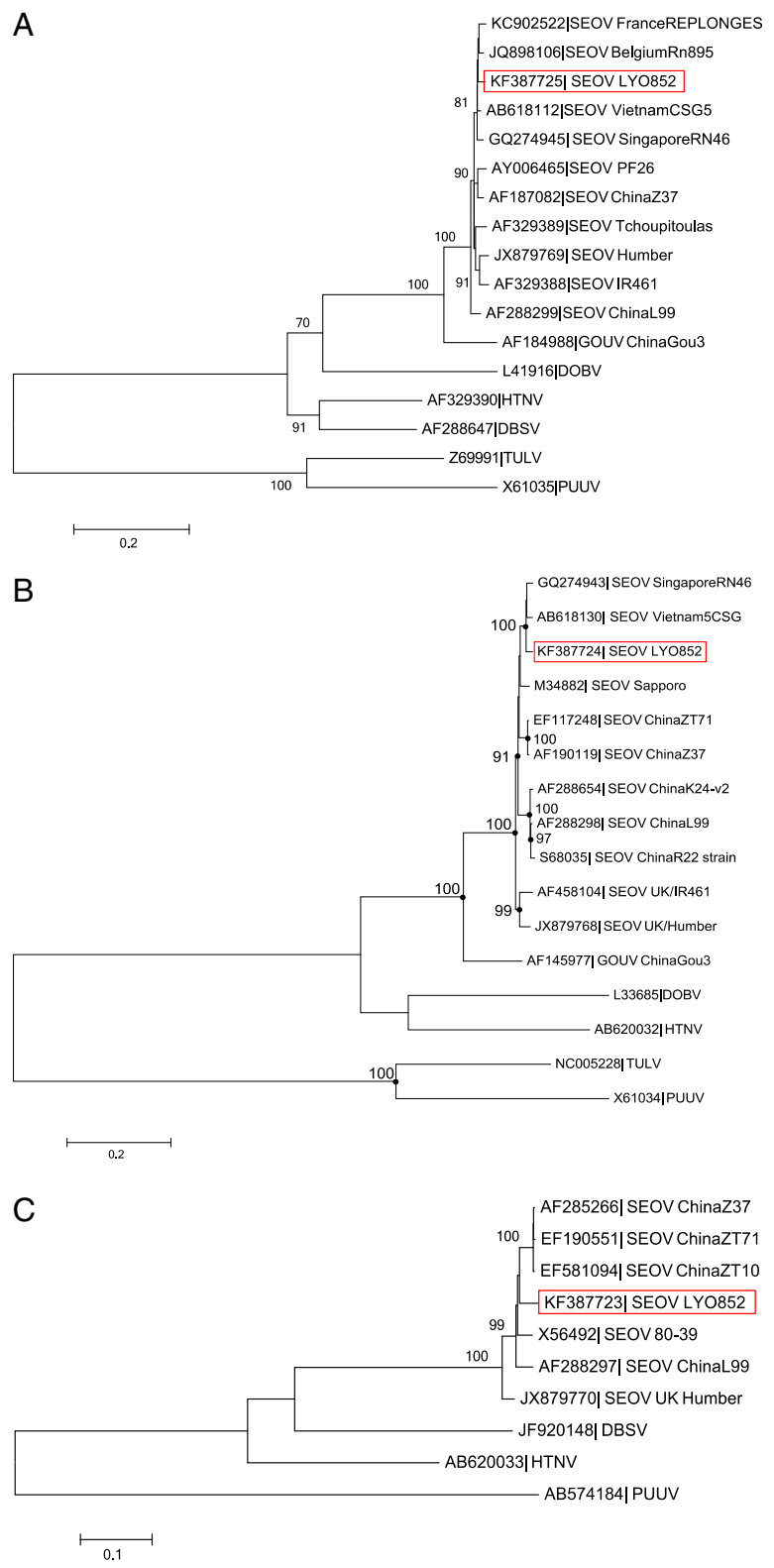
Immediately after collection, lung tissue was stored at -80°C pending further analysis. Approximately 50 to 100 mg of lung tissue was homogenised in 1 ml TRIzol® Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) with QIAGEN Stainless steel beads (5 mm) using a QIAGEN TissueLyser (Qiagen, UK) for 2 mins at 30 Hz. RNA was extracted from the homogenate according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK). The RNA samples were reverse transcribed using random hexamers and screened for hantavirus as previously described [5] employing a pan-hantavirus nested RT-PCR directed against partial polymerase (L) gene sequences [34].

### Phylogenetic analysis of partial L gene sequences

Multiple nucleotide sequence alignments of the 18 partial polymerase gene sequences and available published SEOV sequences were generated in MEGA5 [35]. Sequence identities were compared using Geneious 5.6.5. Optimum substitution models were estimated and maximum likelihood phylogenetic trees generated in MEGA5 [35] with bootstrap replications of 10,000 [36].

### Roche-454 and Illumina platform sequencing

Initially, the Roche-454 was employed to obtain genome sequence for a representative Lyon SEOV following previous optimisation and success in obtaining complete genome coverage for lyssaviruses using this platform [37]. Viral specific reads from LY0852 were obtained directly from lung tissue on the Roche 454 platform without the use of viral enrichment or ultra centrifugation. Briefly, for performing 454 Roche sequencing, the TRIzol® extracted viral RNA obtained during hantavirus screening was depleted of host genomic DNA using RNase-free DNase (Qiagen, UK) and host ribosomal RNA was depleted using Terminator™ 5'-Phosphate-Dependent Exonuclease (Epicentre Biotechnologies) as described previously [37]. The RNA was fragmented, a random-primed cDNA library was made and run using the Roche 454 GS FLX System. The sequencing data were initially assembled in the GS *de novo* assembly software (Roche). Subsequently, previously published SEOV sequences were used to map specific reads from the original raw data using GS Reference Mapper (Roche).



**Figure 3** (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

**Figure 3 Phylogenetic tree of hantaviruses based on the S, M and L segment sequences (complete coding region).** All analyses were performed using the MEGA software [35]. **A.** S segment: analysis was performed applying the generalized time reversible model (GTR) using a Gamma distribution with five rate categories and invariant site (+G + I). Only bootstrap percentages  $\geq 70\%$  (from 1000 resamplings) are indicated. **B.** M segment: analysis was performed applying the generalized time reversible model (GTR) using a Gamma distribution with five rate categories (+G). For clarity purpose, the nodes corresponding to bootstrap percentages  $\geq 70\%$  (from 1000 resamplings) are indicated by dots. **C.** L segment: analysis was performed applying the generalized time reversible model (GTR) using a Gamma distribution with five rate categories (+G). Only bootstrap percentages  $\geq 70\%$  (from 500 resamplings) are indicated. The scale bars indicate nucleotide substitution per site. The red boxes highlight the LYO852 strain described in the present study. Accession numbers are indicated for each strain in the corresponding taxa name.

Subsequently Illumina sequencing was assessed. Total RNA extractions were performed using RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The remaining rRNA was depleted using ScriptSeq complete gold kit Human/Mouse/Rat (Epicentre) following manufacturer instructions and controlled with the 2100 Bioanalyzer using "Eukaryote total RNA Pico Assay" (Agilent Technologies). 3.5-5 ng of depleted RNA was prepared for NGS using the Illumina protocol where 10 cycles of PCR were performed and standard TruSeq adapters and TruSeq barcoded primers were used. A final size selection was performed by native agarose gel electrophoresis to yield a library of inserts 250-350 bases in length. The library was extracted from the agarose gel using purification columns. The prepared library was then loaded onto an Illumina HiSeq 2500 v3 single read flow cell, standard cluster generation was performed on a Cbot and sequenced for 50 bases.

#### Sequence reads

Reads were processed using CASAVA 1.8.2 and demultiplexed based on index sequences. The FastQC was used for Quality Check. Sequences were aligned, first, using TopHat 2.0.6 to the Rat genome and the unaligned reads were aligned using Bowtie 2.0.2 software against known viruses.

#### Viral enrichment and Illumina Hiseq 2500 v3 sequencing

The different approaches for virus enrichment were also evaluated in this study for the infected lung tissue sample (LYO852) (Figure 2). Briefly, a piece of lung tissue was immersed in 1 ml of HBSS 1X and homogenized with micropestle and then placed on dry ice for approximately two minutes until frozen, and thawed quickly before returning to ice. Homogenization followed by freezing and thawing was repeated a further two times to disrupt the cells. Samples were then spun at  $1500 \times g$  for 5 minutes at  $4^\circ\text{C}$  to pellet the nuclei and large cellular aggregates. The resulting supernatant was transferred to a new tube and 2 different treatments were applied: for the condition S2 a step-wise filtration process involving  $0.45 \mu\text{m}$  polyethersulfone membrane filters (diameter 13 mm) (Millipore) was performed before RNA extraction. Condition S3 combined a step-wise filtration and a

2-step digestion with 25U of RNase I at  $37^\circ\text{C}$  for 90 min in  $1 \times$  RNase I buffer and DNA is removed on-column (Qiagen). Following treatment, we extracted viral encapsidated RNA and residual host nucleic acids using the RNeasy mini extraction kit (Qiagen). Viral RNA was eluted to a final volume of 30  $\mu\text{l}$ . Total RNA concentration was quantified with Quant-iT ribogreen RNA kit (Invitrogen).

The remaining rRNA was depleted using ScriptSeq complete gold kit Human/Mouse/Rat (Epicentre) following the manufacturer's instructions and quantified using the 2100 Bioanalyzer using "Eukaryote total RNA Pico Assay" (Agilent Technologies).

#### Reverse transcription and qPCR quantification

cDNA was generated with random hexamers using the iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). RNA (30 ng) from each sample was incubated in the presence of  $5 \times$  iScript reaction mix (containing iScript Reverse transcriptase) and nuclease-free water added to bring the final reaction volume to 20  $\mu\text{l}$ . This volume was incubated at  $25^\circ\text{C}$  for 5 min, at  $42^\circ\text{C}$  for 30 min, at  $85^\circ\text{C}$  for 5 min. To quantify the enrichment of viral RNA, we performed various real-time PCRs targeting cDNA of Seoul Hantavirus, GAPDH and  $\beta$ -actin (see Additional file 2 for primer details). We calculated the fold enrichment in viral RNAs by comparing the proportion of encapsidated viral RNA CT (threshold cycle) values between the control and each treatment.

#### Genetic and phylogenetic analysis of genomic segments

The deduced amino acid sequences of the 3 genomic segments of the LYO852 strain were obtained using the Serial Cloner 2.6.1 software. The complete coding sequence of the S, M and L segments and the predicted protein sequences were compared to the NCBI database using the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Multiple sequence alignments of coding sequences were carried out using ClustalW algorithm in the MEGA 5.2.2 software (default parameters) [35]. Phylogenetic reconstructions were performed using the Maximum Likelihood statistical method. Bootstrapping (1000 or 500 resamplings) was applied according to the best-fit substitution model recommended.

## Additional files

**Additional file 1: The locations of the trapping sites (circles) within a) France and b) Rhône-Alps department.** SEOV positive variants 'Lyon I, II and III' are represented by a star, triangle and blocked out circles, respectively.

**Additional file 2: A-Distribution of the SEOV variants detected in 6 of the 23 sites sampled. B-Oligonucleotides used in this study.** vRNA: viral RNA.

## Competing interests

All of the authors declare that they have no competing interests with respect to the publication of this manuscript.

## Authors' contributions

TD, KCP, DAM and KV were involved in the PCR screening and NGS work. SL, CR, FB and NN were involved in viral enrichment and Illumina sequencing. MHL was involved in phylogenetic analysis. PM, MA, MP, ARF, JL, CLL and LMM were involved in project conception, data analysis and logistical support. FA coordinated the trapping and post-mortems of the rodents as part of the WildTech consortium (http://www.wildtechproject.com/wildtech/). All authors contributed to the writing of this manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We acknowledge financial support from the European Commission under the Food, Agriculture and Fisheries, and Biotechnology theme of the 7<sup>th</sup> Framework Program for Research and Technological Development, FP7 'WildTech' project grant agreement no. 222633 and FP7 'European Virus Archive' project – grant agreement no 19 228292. We also acknowledge funding from the UK Defra surveillance projects SV3037 & FZ2100. Technical support and assistance was also provided by Emma Wise, Richard Ellis and Charlotte Featherstone (AHVLA). We acknowledge special financial support from VetagroSup for the post-doctoral grant (TD) and we also acknowledge Pr Etienne Benoit (USC1233) for his constant support.

## Author details

<sup>1</sup>Université de Lyon, VetAgro Sup, USC 1233/Equipe « Pathogènes émergents et rongeurs sauvages (PERS), F-69280 Marcy-L'Etoile, France. <sup>2</sup>Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Crown Street, Liverpool L69 7ZB, UK. <sup>3</sup>Wildlife Zoonoses and Vector-borne Diseases Research Group, Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (AHVLA), New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB, UK. <sup>4</sup>Ansès-Laboratoire de Lyon, Unité Virologie, F-69347 Lyon, France. <sup>5</sup>Viroscan 3D / Profilexpert, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 3453 CNRS-US7 Inserm, 8 avenue Rockefeller, aile C2, 69373, Lyon Cedex 08, France. <sup>6</sup>National Consortium for Zoonosis Research, University of Liverpool, Leahurst, Neston, South Wirral CH64 7TE, UK.

Received: 30 October 2013 Accepted: 27 January 2014

Published: 20 February 2014

## References

- Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, Barrière P, Koivogui L, ter Meulen J, Krüger DH: **Novel hantavirus sequences in shrew, Guinea.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:520–522.
- Weiss S, Witkowski PT, Auste B, Nowak K, Weber N, Fahr J, Mombouli JV, Wolfe ND, Drexler JF, Drosten C, Klempa B, Leendertz FH, Krüger DH: **Hantavirus in bat, Sierra Leone.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18**:159–161.
- Ramsden C, Holmes EC, Charleston MA: **Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence.** *Mol Biol Evol* 2009, **26**:143–153.
- Vaheri A, Henttonen H, Voutilainen L, Mustonen J, Sironen T, Vapalahti O: **Hantavirus infections in Europe and their impact on public health.** *Rev Med Virol* 2012, **23**:35–49.
- Pounder KC, Begon M, Sironen T, Henttonen H, Watts PC, Voutilainen L, Vapalahti O, Klempa B, Fooks AR, McElhinney LM: **Novel hantavirus in field vole, United Kingdom.** *Emerg Infect Dis* 2013, **19**:673–675.
- Heyman P, Ceianu CS, Christova I, Tordo N, Beersma M, João Alves M, Lundkvist A, Hukic M, Papa A, Tenorio A, Zelená H, Essbauer S, Visontai I, Golovljova I, Connell J, Nicoletti L, Van Esbroeck M, Dudman SG, Aberle SW, Avšič-Županc T, Korukluoglu G, Nowakowska A, Klempa B, Ulrich RG, Bino S, Engler O, Opp M, Vaheri A: **A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005–2010.** *Euro Surveill* 2011, **16**:19961.
- Olsson GE, Leirs H, Henttonen H: **Hantaviruses and their hosts in Europe: reservoirs here and there, but not everywhere?** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, **10**:549–561.
- Kariwa H, Yoshimatsu K, Araki K, Chayama K, Kumada H, Ogino M, Ebihara H, Murphy ME, Mizutani T, Takashima I, Arikawa J: **Detection of hantaviral antibodies among patients with hepatitis of unknown etiology in Japan.** *Microbiol Immunol* 2000, **44**:357–362.
- Kim YS, Ahn C, Han JS, Kim S, Lee JS, Lee PW: **Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by the Seoul virus.** *Nephron* 1995, **71**:419–427.
- Song G: **Epidemiological progresses of hemorrhagic fever with renal syndrome in China.** *Chin Med J* 1999, **112**:472–477.
- Zhang YZ, Zhang FX, Wang JB, Zhao ZW, Li MH, Chen HX, Zou Y, Plyusnin A: **Hantaviruses in rodents and humans, Inner Mongolia Autonomous Region, China.** *Emerg Infect Dis* 2009, **15**:885–891.
- Glass GE, Watson AJ, LeDuc JW, Childs JE: **Domestic cases of hemorrhagic fever with renal syndrome in the United States.** *Nephron* 1994, **68**:48–51.
- Iversson LB, da Rosa AP, Rosa MD, Lomar AV, Sasaki MG, LeDuc JW: **Human infection by hantavirus in southern and southwestern Brazil.** *Rev Assoc Med Bras* 1994, **40**:85–92.
- Lin XD, Guo WP, Wang W, Zou Y, Hao ZY, Zhou DJ, Dong X, Qu YG, Li MH, Tian HF, Wen JF, Plyusnin A, Xu JG, Zhang YZ: **Migration of Norway rats resulted in the worldwide distribution of Seoul hantavirus today.** *J Virol* 2012, **86**:972–981.
- Heyman P, Plyusnina A, Berny P, Cochez C, Artois M, Zizi M, Pirnay JP, Plyusnin A: **Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004, **23**:711–717.
- Heyman P, Baert K, Plyusnina A, Cochez C, Lundkvist A, Esbroeck MV, Goossens E, Vandenvelde C, Plyusnin A, Stuyck J: **Serological and genetic evidence for the presence of Seoul hantavirus in *Rattus norvegicus* in Flanders, Belgium.** *Scand J Infect Dis* 2009, **41**:51–56.
- Jameson LJ, Logue CH, Atkinson B, Baker N, Galbraith SE, Carroll MW, Brooks T, Hewson R: **The continued emergence of hantaviruses: isolation of a Seoul virus implicated in human disease, United Kingdom, October 2012.** *Euro Surveill* 2013, **18**:4–7.
- Jameson LJ, Taori SK, Atkinson B, Levick P, Featherstone CA, van der Burgt G, McCarthy N, Hart J, Osborne JC, Walsh AL, Brooks T, Hewson R: **Pet rats as a source of hantavirus in England and Wales, 2013.** *Euro Surveill* 2013, **18**:20415.
- Lundkvist A, Verner-Carlsson J, Plyusnina A, Forslund L, Feinstein R, Plyusnin A: **Pet rat harbouring Seoul hantavirus in Sweden, June 2013.** *Euro Surveill* 2013, **18**:20521.
- Featherstone CA, Wyllie S, Frost AJ, McElhinney L, Fooks AR: **Hantavirus and pet rodents.** *Vet Rec* 2013, **172**:370–370.
- Macé G, Feyeux C, Mollard N, Chantegret C, Audia S, Rebibou JM, Spagnolo G, Bour JB, Denoyel GA, Sagot P, Reynes JM: **Severe Seoul hantavirus infection in a pregnant woman, France, October 2012.** *Euro Surveill* 2013, **18**:20464.
- Taori SK, Jameson LJ, Campbell A, Drew PJ, McCarthy ND, Hart J, Osborne JC, Sudhanva M, Brooks TJG: **UK hantavirus, renal failure, and pet rats.** *Lancet* 2013, **381**:1070–1070.
- Cueto GR, Cavia R, Bellomo C, Padula PJ, Suárez OV: **Prevalence of hantavirus infection in wild *Rattus norvegicus* and *R. rattus* populations of Buenos Aires City, Argentina.** *Trop Med Int Health* 2008, **13**:46–51.
- Glass GE, Childs JE, Korch GW, LeDuc JW: **Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*).** *Epidemiol Infect* 1988, **101**:459–472.
- Klein SL, Bird BH, Glass GE: **Sex differences in Seoul virus infection are not related to adult sex steroid concentrations in Norway rats.** *J Virol* 2000, **74**:8213–8217.
- Hinson ER, Shone SM, Zink MC, Glass GE, Klein SL: **Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **70**:310–317.
- Plyusnina A, Ibrahim IN, Winoto I, Porter KR, Gotama IBI, Lundkvist A, Vaheri A, Plyusnin A: **Identification of Seoul hantavirus in *Rattus norvegicus* in Indonesia.** *Scand J Infect Dis* 2004, **36**:356–359.

28. Tamura K: **Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases.** *Mol Biol Evol* 1992, **9**:678–687.
29. Luan VD, Yoshimatsu K, Endo R, Taruishi M, Huong VT, Dat DT, Tien PC, Shimizu K, Koma T, Yasuda SP, Nhi L, Vu TQH, Arikawa J: **Studies on hantavirus infection in small mammals captured in southern and central highland area of Vietnam.** *J Vet Med Sci* 2012, **74**:1155–1162.
30. Truong TT, Yoshimatsu K, Araki K, Lee BH, Nakamura I, Endo R, Shimizu K, Yasuda SP, Koma T, Taruishi M, Okumura M, Truong UN, Arikawa J: **Molecular epidemiological and serological studies of hantavirus infection in Northern Vietnam.** *J Vet Med Sci* 2009, **71**:1357–1363.
31. Johansson P, Yap G, Low HT, Siew CC, Kek R, Ng LC, Bucht G: **Molecular characterization of two hantavirus strains from different rattus species in Singapore.** *Virol J* 2010, **7**:15.
32. Löber C, Anheier B, Lindow S, Klenk HD, Feldmann H: **The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA.** *Virology* 2001, **289**:224–229.
33. Plyusnina A, Heyman P, Baert K, Stuyck J, Cochez C, Plyusnin A: **Genetic characterization of seoul hantavirus originated from norway rats (*Rattus norvegicus*) captured in Belgium.** *J Med Virol* 2012, **84**:1298–1303.
34. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, Denys C, Koivogui L, ter Meulen J, Krüger DH: **Hantavirus in African wood mouse, Guinea.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:838–840.
35. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Mol Biol Evol* 2011, **28**:2731–2739.
36. Felsenstein J: **Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap.** *Evolution* 1985, **39**:783–791.
37. Marston DA, McElhinney LM, Ellis RJ, Horton DL, Wise EL, Leech SL, David D, de Lamballerie X, Fooks AR: **Next generation sequencing of viral RNA genomes.** *BMC Genomics* 2013, **14**:444.

doi:10.1186/1743-422X-11-32

**Cite this article as:** Dupinay et al.: Detection and genetic characterization of Seoul Virus from commensal brown rats in France. *Virology Journal* 2014 **11**:32.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





Annexe 7

High-Resolution Typing of *Leptospira interrogans* Strains

by Multispacer Sequence Typing.

J Clin Microbiol. 2014, 52(2):564-71.

Zilber AL, Picardeau M, **Ayral F**, Artois M, Demont P, Kodjo A, Djelouadji Z

# High-Resolution Typing of *Leptospira interrogans* Strains by Multispacer Sequence Typing

Anne-Laure Zilber,<sup>a</sup> Mathieu Picardeau,<sup>b</sup> Florence Ayrat,<sup>a</sup> Marc Artois,<sup>a</sup> Pierre Demont,<sup>c</sup> Angeli Kodjo,<sup>a,c</sup> Zoheira Djelouadji<sup>a,c</sup>

USC1233 INRA/VAS, Equipe PERS, Etablissement VetAgro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Etoile, France<sup>a</sup>; Institut Pasteur, Unité de Biologie des Spirochètes, National Reference Center and WHO Collaborating Center for Leptospirosis, Paris, France<sup>b</sup>; Laboratoire des Leptospirales, Etablissement VetAgro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Etoile, France<sup>c</sup>

Leptospirosis is a worldwide zoonosis which is responsible for the typical form of Weil's disease. The epidemiological surveillance of the *Leptospira* species agent is important for host prevalence control. Although the genotyping methods have progressed, the identification of some serovars remains ambiguous. We investigated the multispacer sequence typing (MST) method for genotyping strains belonging to the species *Leptospira interrogans*, which is the main agent of leptospirosis worldwide. A total of 33 DNA samples isolated from the reference strains of *L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae, Australis, Canicola, and Grippotyphosa, which are the most prevalent serogroups in France, were analyzed by both the variable-number tandem-repeat (VNTR) and MST methods. An MST database has been constructed from the DNA of these reference strains to define the MST profiles. The MST profiles corroborated with the VNTR results. Moreover, the MST analysis allowed the identification at the serovar level or potentially to the isolate level for strains belonging to *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, which then results in a higher resolution than VNTR (Hunter-Gaston index of 0.94 versus 0.68). Regarding *L. interrogans* serogroups Australis, Canicola, and Grippotyphosa, the MST and VNTR methods similarly identified the genotype. The MST method enabled the acquisition of simple and robust results that were based on the nucleotide sequences. The MST identified clinical isolates in correlation with the reference serovar profiles, thus permitting an epidemiological surveillance of circulating *L. interrogans* strains, especially for the Icterohaemorrhagiae serogroup, which includes the most prevalent strains of public health interest.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis with high mortality and morbidity rates in humans (1). The current reports estimate that more than 500,000 severe cases occur annually throughout the world (2). Recent outbreaks have increased with the rainfall (2, 3) and the urbanization associated with the conditions of slum living (2, 4, 5). In humans, the infection ranges from a mild form to a severe infection with fever, jaundice, and renal failure (Weil's disease), which leads to death in 5 to 10% of all patients with leptospirosis (4, 6, 7). In animals, leptospirosis can cause reproductive failure, with abortion and infertility in cattle and acute febrile illness with renal and hepatic failure in dogs (8).

Leptospirosis is caused by spirochetes, which belong to the family *Leptospiraceae*. Actually, two classifications of *Leptospira* spp. coexist, with one based on serological analyses and the other on genomic classification. The serologic classification of *Leptospira* spp. is based on the expression of the lipopolysaccharide (LPS) antigens and has been used to define more than 300 serovars (1). The DNA-DNA hybridization data have been used to classify the genus *Leptospira* into 21 genomospecies, including saprophytic, intermediate, and pathogenic species (1, 7, 9, 10).

The identification of a *Leptospira* species isolate has important implications for both diagnosis and epidemiology. During the serological diagnosis, the identification permits the establishment of the serogroup responsible for the infection. Moreover, the serogroup identification enables the determination of the animal reservoir and the prevalence of serogroup according to geographic regions (4), which can then be used to plan updates to the vaccine components (11, 12).

The serological reference test, which is the microscopic agglutination test (MAT), is a specific and complex procedure performed by reference laboratories. This method is a serogroup-

specific test rather than a serovar-specific test, because cross-reactions between different serovars from the same serogroup can occur (8, 13), which means that the serovar identification is uncertain, thereby limiting its power as an epidemiological tool.

Several genotyping methods have been developed to tentatively identify the isolates to the serovar level. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (14, 15) is a standardized method that can identify 90% of the pathogenic *Leptospira* species serovars (15, 16). Moreover, the discrimination of certain pathogenic serovars, such as Pomona, Icterohaemorrhagiae, and Copenhageni, is still difficult by PFGE (14, 17). Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (18) was part of the routine analysis for the diagnosis of *Leptospira* species genotypes. This method has been standardized and requires only simple PCR equipment. The VNTR analysis enables the serovar identification of causal agents that belong to the *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, and *Leptospira borgpetersenii* species. However, its resolution is dependent on the agarose component of the electrophoresis gel, and the analysis of nearby fragment sizes can occasionally be ambiguous (19). Moreover, the differentiation of certain serovars, such as between *L. interrogans* serovars Icterohaemorrhagiae and Copen-

Received 6 September 2013 Returned for modification 2 October 2013

Accepted 2 December 2013

Published ahead of print 11 December 2013

Editor: A. B. Onderdonk

Address correspondence to Zoheira Djelouadji, zoree.djelouadji@vetagro-sup.fr.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02482-13

TABLE 1 MST primers used for the PCR amplification and sequencing of *L. interrogans* isolates

Spacer	ORF upstream (F) and downstream (R) of spacer sequence <sup>a</sup>	Position and nucleotide sequence (5'→3')	PCR product size (bp) <sup>a</sup>
MST1 F	Hypothetical protein	210612 ACG GGA GAA TCT GTC AAA GG	207–263
MST1 R	Hypothetical protein	210837 AAA TTC ACT GAT TAC CTC CAC CA	
MST3 F	4-Diphosphocytidil-2-C-methyl-D-erythriol kinase	3792625 ACG ATC GTG CCA ATG TTT TT	361–375
MST3 R	Transcriptional regulator	3793059 AAA ATT CAA ACC GGC AAA TG	
MST4 F	Hypothetical protein	3656262 GGT TTA TTT GAA ATC ATG AAA ACT TCT	323–328
MST4 R	Hypothetical protein	3656586 TAT CTT TTA TTC AAT CTT GTG AAT CC	
MST7 F	Inhibitor of MCP methylation	2448482 AAA AGG CCT TCT TGG GTT TA	392–393
MST7 R	Hypothetical protein	2448875 GAT CAA CGG TCC GTA AAA CG	
MST9 F	Bifunctional 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate	1155922 TTT GAA AAA CGA CTG AGG TCA A	236–237
MST9 R	Hypothetical protein	1156167 TCG ATA TCG GCA CAA AAT CA	

<sup>a</sup> ORF, open reading frame; F, forward; R, reverse. Based on the *L. interrogans* serovar Lai strain Lai 56601 genome sequence reference (GenBank accession no. [AE010300.2](#)).

hageni or between *L. interrogans* serovars Bratislava and Australis, remains difficult (20). Recently, a genotyping method based on the partial sequences of some housekeeping genes, known as multilocus sequence typing (MLST), has been developed for a phylogenetic analysis of *Leptospira* species isolates (21, 22). MLST produced nonambiguous, specific results with a good resolution. However, MLST demonstrated an inability to distinguish certain isolates at the serovar level, such as for Icterohaemorrhagiae and Copenhageni (23).

Recently, multispacer sequence typing (MST) has emerged as a new genotyping method, which is based on the comparison of the nucleotide sequences of several intergenic regions. The spacers seem to be more variable than coding genes, because they were less submitted to selection pressure (24). MST has been developed to genotype several pathogens, including *Rickettsia conorii* (24), *Bartonella quintana* (25), and *Mycobacterium tuberculosis* (26). MST produced reproducible and robust results with a high discriminatory power compared with that of MLST (24). Moreover, MST permitted the phylogeographical lineages to be defined (26), which is of great interest in epidemiologic studies. In this study, we investigated the MST for *L. interrogans* species genotyping, particularly for the Icterohaemorrhagiae, Canicola, Australis, and Grippotyphosa serogroups, which are the most prevalent serogroups in France (12, 27–30). The results of MST genotyping have been subsequently compared with the results of the VNTR analysis used as the reference molecular typing method.

## MATERIALS AND METHODS

**Selection of MST spacers.** The complete genome sequences of *L. interrogans* serovar Lai strain Lai 56601 (GenBank accession no. [AE010300.2](#)) and *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 (GenBank accession no. [AE016823.1](#)) were investigated by the EMBOSS software (<http://www.emboss.sourceforge.net>). The intergenic spacers were further extracted from the reference genomes using Script software. The homologous spacer comparisons were analyzed by the Difseq software in EMBOSS. Then, an NCBI BLAST of these homologous spacers was performed to detect the differences between these spacer sequences. The spacers were selected using the following criteria: (i) sequence length of  $\leq 400$  bp, (ii) software script-filtered range of sequence similarity of 70 to 99% between *L. interrogans* genomes, and (iii) a difference between *L. interrogans* serovar Lai and Copenhageni sequences of  $\geq 5$  bp. The spacer homology between the *L. interrogans* genomes was further ensured by the presence of the same homologous genes upstream and downstream of the spacers. A dot plot was constructed for each spacer to visualize the type of genetic events that were responsible for the spacer sequence heterogeneity, i.e., insertion, deletion, or mutation. The PCR primers for the spacers

were designed using the Primer3 software program (Infobiogen, Evry, France) and are indicated in Table 1.

**Leptospira sp. strains.** The development of MST for *L. interrogans* species was conducted by the amplification and sequencing of spacers using DNA samples from 33 *Leptospira* sp. reference strains provided by the National Reference Center and WHO Collaboration Center for Leptospirosis (Institut Pasteur, Paris, France) and the Laboratoire des Leptospores. These strains, which are listed in Table 2, belonged to four serogroups (*L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae, Australis, Canicola, and Grippotyphosa) that were chosen for their high prevalence in France (27).

The DNA was also extracted from 35 clinical isolates, including 25 isolates from human patients with leptospirosis (isolated by the University Hospitals of Pointe à Pitre in Guadeloupe and Fort de France in Martinique and the National Reference Center of Leptospirosis as part of the national surveillance of leptospirosis) and 10 isolates that were isolated from rats (*Rattus norvegicus*) trapped in five areas inside or in the suburb of the town of Lyon (France) in 2012. These captures were facilitated by collaboration with several pest control operations. Captures and euthanasia of rats were performed in accordance with the European Union legislation (directive 86/609/EEC) and conducted by two of us, authorized to perform the rodent experiments (authorization no. 69-080931 by the “Préfecture du Rhône”). Rats are considered invasive mammals in France, and rat samples are material for which no ethical committee approval has been required. Beforehand, all specimens yielded a PCR-positive result with a cycle threshold ( $C_T$ ) inferior to 31 cycles using a specific pathogenic *Leptospira* species TaqMan real-time PCR kit (TaqVet PathoLept, LSI, Lissieu, France).

**VNTR analysis.** The *Leptospira* sp. reference strains and clinical specimens were genotyped using the VNTR method (18). The PCRs were performed in a final volume of 50  $\mu$ l containing the following: 35  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l of 10 $\times$  buffer (Qiagen, Courtaboeuf, France), 2  $\mu$ l of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l of deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 1  $\mu$ l of forward primer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l of reverse primer (10  $\mu$ M), 1.5 U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen), and 12 ng of target DNA. The samples were amplified as previously described (18). After a 4-hour 1.8% agarose MS-8 gel electrophoresis (Conda Pronadisa, Madrid, Spain), the amplified products were analyzed, and the sizes of the amplicons were defined by comparison with a 100-bp DNA ladder (Promega France, Lyon, France), with the size of the reference strain used as a control (18).

**MST analysis.** The MST PCRs were performed in a final volume of 50  $\mu$ l containing 35  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l of 10 $\times$  buffer (Qiagen), 2  $\mu$ l of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l of 10 mM dNTPs (Qiagen), 1  $\mu$ l of forward primer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l of reverse primer (10  $\mu$ M), 1.5 U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen), and 12 ng of target DNA. The PCRs were performed according to the following program: 15 min of enzyme activation at 95°C, followed by 40 cycles consisting of 95°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 1 min and a 10-min final elongation step at 72°C. After controlling the size of the

TABLE 2 MST analysis of 33 *L. interrogans* reference strains

<i>L. interrogans</i> serogroup	<i>L. interrogans</i> serovar	Strain	Origin	No. of genotypes by MST typing/profile		
				MST1	MST3	MST9
Icterohaemorrhagiae	Birkini	Birkini	Malaysia	3	1	1
Icterohaemorrhagiae	Mwogolo	Korea	Korea	3	1	1
Icterohaemorrhagiae	Lai	Lai 56601	China	2	5	2
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20	Denmark	4	6	3
Icterohaemorrhagiae	Mankarso	Mankarso	Indonesia	3	3	4
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	CHU Réunion	La Réunion (France)	4	10	3
Icterohaemorrhagiae	Naam	Naam	Indonesia	3	2	1
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	R1		4	7	3
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	Belgium	4	8	3
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Shibaura 9	Japan	4	9	3
Icterohaemorrhagiae	Smithi	Smith	Malaysia	4	4	5
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun	France	4	8	3
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Wijenberg	The Netherlands	4	6	3
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz L1-130	Brazil	4	8	3
Australis	Muenchen	Munchen C90	Germany	5	11	6
Australis	Jalna	Jalna	Czechoslovakia	5	11	6
Australis	Fugis	Fudge	Malaysia	3	4	5
Australis	Bratislava	Jez-Bratislava	Czechoslovakia	6	3	3
Australis	Bangkok	Bangkok-D92	Thailand	1	2	3
Australis	Australis	Ballico	Australia	6	3	3
Canicola	Benjamini	Benjamin	Indonesia	9	2	11
Canicola	Bindjei	Bindjei	Indonesia	14	4	1
Canicola	Broomi	Patane	Australia	7	3	7
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	The Netherlands	8	12	3
Canicola	Jonsis	Jones	Malaysia	9	14	2
Canicola	Kuwait	136/2/2	Kuwait	11	13	8
Canicola	Portlandvere	MY 1039	Jamaica	8	12	7
Canicola	Schueffneri	Vleermuis 90C	Indonesia	9	14	2
Canicola	Sumneri	Sumner	Malaysia	12	15	1
Grippytyphosa	Grippytyphosa	Andaman	Andaman Islands	8	2	3
Grippytyphosa	Liangguang	1880	China	10	16	9
Grippytyphosa	Muelleri	RM 2	Malaysia	5	4	3
Grippytyphosa	Valbuzzi	Valbuzzi	Australia	13	17	10

amplified fragments on 1.5% agarose gel electrophoresis (Electran agarose DNA pure grade; VWR, Fontenay sous Bois, France), the PCR products were sequenced with the BigDye Terminator sequencing kit using the 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The sequences were edited using the ChromasPro program and aligned using NPS Multalin multiple alignment (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>). Direct visual examination of the edited alignments was also conducted to reduce the risk of alignment errors.

**Reproducibility and discriminatory power.** The stability of MST typing was evaluated on two serial cultures of *L. interrogans* reference isolates and on clinical isolates. The discrimination power of MST was evaluated and compared with that of the VNTR method using the Hunter-Gaston index, which was estimated as

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

where  $N$  is the total number of isolates in the sample population,  $S$  is the total number of types described, and  $n_j$  is the number of isolates belonging to the  $j$ th type (31).

**Nucleotide sequence accession numbers.** All of the spacer sequences obtained were deposited in GenBank under accession numbers [KF420439](#) to [KF420480](#).

## RESULTS

**Selection of MST spacers.** A total of 200 spacers were edited by the comparison of the two *L. interrogans* genome sequences according to the previous criteria, from which 16 spacers were selected.

Five spacers, MST1, MST3, MST4, MST7, and MST9, were then chosen based on the high number of genotypes identified *in silico*. The localization of these spacers was determined, and the primers were designed (Table 1).

First, the five spacers were tested on the DNA samples from 14 unrelated strains of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae. The nucleotide sequences obtained were analyzed and used to define several genotypes. The MST1, MST3, and MST9 spacers were more discriminating, resulting in three, 10, and five genotypes, respectively. A database was constructed based on the sequences derived from the selected spacer.

**MST database.** In the present study, the MST analysis focused on four serogroups that were previously analyzed by the VNTR method: *L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae, Australis, Canicola, and Grippytyphosa (18). A total of 33 reference strains were analyzed by MST, including 14 strains belonging to *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae, six strains of serogroup Australis, nine strains of serogroup Canicola, and four strains of serogroup Grippytyphosa (Table 2).

Among the 33 reference strains, the genetic events observed in these spacers were mutations, insertions, and deletions, which were used to identify several genotypes for each spacer. For the MST1 spacer, 14 genotypes were defined, with sizes varying between 207 and 263 bp. The MST1 spacer presented 25 variable

regions, with 18 regions (94.7%) being single nucleotide mutations and one region (5.3%) being an insertion. Moreover, six regions were considered to be multivariable regions, containing one multiple nucleotide insertion region, one single nucleotide mutation, three deletion regions, and two regions containing a single nucleotide sequence insertion. For the MST3 spacer, 17 genotypes were defined based on 14 variable regions. The MST3 sequence size varied between 361 and 375 bp. A total of 12 regions (85.7%) were single nucleotide mutations, one region (7.1%) was a deletion, and one region (7.1%) was a nucleotide sequence insertion. This last region was located between the positions of 215 and 227 and comprised a poly(T) nucleotide sequence. The number of T nucleotides varied from 9 to 13 and allowed *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae to be differentiated into five genotypes. For the MST9 spacer, 11 genotypes were defined. The MST9 sequence size varied between 236 and 237 bp. A total of 11 variable regions were identified, with 10 (90.9%) being single nucleotide mutations and one (9.1%) being an insertion.

The genotypes of these three spacers were combined to define the MST profile for each serovar. The MST genotype sequences were also checked to confirm that they were not coding regions and proved that the sequences targeted were effectively in spacer regions.

**Comparison of MST typing with the VNTR reference method.** The *Leptospira* sp. reference strains were analyzed by both the VNTR and MST methods.

As previously analyzed by Salaun et al. (18), the 33 *Leptospira* sp. strains analyzed in this study provided a unique VNTR profile, except for *L. interrogans* serovars Canicola and Portlandvere, which exhibited the same VNTR profile. Similarly, the strains belonging to the Copenhageni and Icterohaemorrhagiae serovars were not differentiated by the VNTR analysis.

A total of 24 VNTR locus combinations were defined among the 33 reference strains (Table 2), whereas 26 MST locus combinations were defined. MST enabled identification not only at the serogroup and serovar levels but also at the strain level in some cases.

In *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae, including the eight serovars studied, MST permitted the identification of each serovar, except for *L. interrogans* serovars Birkeni and Mwogolo. Moreover, for each serovar, a unique profile was defined for each strain, except for the strains M20 and Wijnberg, belonging to *L. interrogans* serovar Copenhageni, and the strains RGA and Verdun, belonging to *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. In comparison, the VNTR analysis exhibited the same profile for the strains belonging to either *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae or Copenhageni. The index of discrimination of MST and VNTR methods was calculated among serovars of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae and found to be 0.94 and 0.68, respectively.

In *L. interrogans* serogroup Canicola, including the nine serovars analyzed, MST identified each serovar by a unique profile, except for the Jonsis and Schueffneri serovars, which exhibited the same MST combination, whereas their VNTR profiles were different.

In *L. interrogans* serogroup Australis, including six serovars, the Muenchen and Jalna serovars exhibited the same MST profile, as did the Bratislava and Australis serovars. In contrast, each serovar had a unique VNTR profile.

Finally, in *L. interrogans* serogroup Grippotyphosa, the four

**TABLE 3** Discrimination power of MST compared with that of the VNTR method

Typing method	No. of clusters	Size (%) of largest type	No. of unique isolates	Hunter-Gaston index
MST	26	9.1	20	0.985
VNTR	24	24.2	21	0.943

serovars each had a unique profile by both the MST and VNTR methods.

The reproducibility and repeatability of the MST method were evaluated on two serial cultures of four strains of *L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae, Australis, and Canicola and on clinical isolates; the spacer sequences obtained were identical.

The discriminatory power of MST was evaluated and compared with that of the VNTR method based on the results of the present study. MST defined 26 clusters, with the size of the largest type being the three strains of *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. According to the Hunter-Gaston index, MST exhibited an index of discriminatory power of 0.985. With respect to the VNTR profile data, 24 clusters were identified, and the size of the largest type was eight strains of *L. interrogans* serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae. Consequently, the discriminatory power of VNTR was 0.943 (Table 3).

**Application to field and clinical isolates.** A total of 35 field and clinical isolates belonging to *L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae and Australis based on VNTR analysis were tested by the MST method (Table 4).

Twenty-five clinical isolates were isolated from a human source. A total of 18 specimens belonged to *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae. These isolates were divided into three MST profiles but into one VNTR profile. The unique VNTR profile corresponded to the Icterohaemorrhagiae-Copenhageni genotype, whereas the MST profiles permitted the identification of eight samples as the Copenhageni genotype strains M20 and Wijnberg, eight other samples as the Icterohaemorrhagiae genotype strain CHU Réunion, and two samples as the Icterohaemorrhagiae genotype strains RGA and Verdun. Seven clinical samples, belonging to *L. interrogans* serogroup Australis, were defined both with the VNTR and MST methods as the Australis-Bratislava genotype.

For 10 rodents' field isolates, the same VNTR profile was defined and identified as the Icterohaemorrhagiae-Copenhageni genotype, whereas three different MST profiles were obtained, with one corresponding to the Icterohaemorrhagiae genotype strain R1, one to the Icterohaemorrhagiae genotype strain CHU Réunion, and the last one to the Copenhageni genotype strains M20 and Wijnberg. The MST method was also applied on DNA extracts from the kidneys of 10 rodents, showing an MST profile identical to that of the strains isolated from the same rodents.

## DISCUSSION

In this study, we investigated the MST method for the typing of *L. interrogans* strains. The selection of MST as a genotyping method is justified by its good discrimination when it has been applied to other bacteria, such as *Rickettsia conorii* (24), *Bartonella quintana*, and *Bartonella henselae* (25, 32), and by its capacity to define phylogeographical lineage, as demonstrated for Orientalis-like *Yer-*



TABLE 4 MST application to clinical isolates

<i>L. interrogans</i> serogroup	<i>L. interrogans</i> serovar	Strain	Source	Origin	No. of genotypes by spacer			Serovar deduced (strain[s])
					MST1	MST3	MST9	
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200700457	Human	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200704250	Human	France (Nancy)	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200704251	Human	France (Nancy)	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200800857	Human	French Polynesia	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200801909	Human	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200803290	Human	France (Vesoul)	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200803792	Human	French Polynesia	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200804216	Human	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200900101	Human	French Polynesia	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200901382	Human	Guadeloupe	4	8	3	Icterohaemorrhagiae (RGA/Verdun)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200901383	Human	Guadeloupe	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200903008	Human	French Polynesia	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201000456	Human	Guadeloupe	4	8	3	Icterohaemorrhagiae (RGA/Verdun)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201000458	Human	Guadeloupe	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201000929	Human	French Polynesia	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201000930	Human	French Polynesia	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201100517	Human	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200201190	Human	Guadeloupe	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Australis	Australis	200701474	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	200701475	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	200703202	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	200703203	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	201001460	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	201000439	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	201100860	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200210109	Rattus	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0505	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0834	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	7	3	Icterohaemorrhagiae (R1)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0854	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0867	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0869	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0872	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0873	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0874	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0884	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)

*sinia pestis* (33) and *Mycobacterium tuberculosis* (26). An MST database was created from spacer sequences obtained for *Leptospira* sp. strains belonging to the Icterohaemorrhagiae, Australis, Grippotyphosa, and Canicola serogroups (Table 2), which are highly prevalent in France, with the seroprevalence of the Icterohaemorrhagiae serogroup in rodents being as high as 45.6% (12, 27–30).

The choice of spacer was based on the same MLST scheme (21). In the present study, 200 loci were identified in the genomes, of which 16 spacers were selected according to the criteria defined below. We then combined three spacers for discriminating strains within the same serovar, enabling the identification of 26 genotypes among the 33 strains of *L. interrogans*.

The spacers were selected according to the following criteria. The sequence size of  $\leq 400$  bp permitted the evolution of the MST PCR method toward real-time PCR. The 70 to 99% sequence similarity between the two *L. interrogans* reference complete genomes allowed the selection of homologous spacers belonging to the same *Leptospira* species. The spacer variability of  $\geq 5$  bp permitted the selection of highly discriminatory regions. Moreover, the MST spacer selection was based on the discriminatory power of *L. in-*

*terrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae, which is the serogroup that presents ambiguous identification between the Icterohaemorrhagiae and Copenhageni serovars when analyzed by other typing method, such as PFGE and VNTR (17, 18).

Each sequence's spacer presented mutation and/or insertion or deletion genetic events. Moreover, the MST1 and MST3 spacers have deletion events and one variable region. For the MST1 spacer, the variable region permits the identification of five different genotypes in *L. interrogans* serogroups Australis, Canicola, and Grippotyphosa. For the MST3 spacer, the variable region allows the discrimination of strains belonging to *L. interrogans* serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni. For the MST9 spacer, the mutation and insertion genetic events identified permit discrimination among the four serogroups when used in combination with MST1 and MST3.

In the present study, among the 33 strains studied, a total of 26 MST profiles were defined, whereas 24 genotypes were defined by the VNTR method.

A total of 14 strains of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae were analyzed, with four strains belonging to the Icterohaemorrhagiae serovar and four to the Copenhageni serovar. The

MST method permits the strains of the Copenhageni and Icterohaemorrhagiae serovars to be differentiated into five distinct profiles, in contrast to the unique profile by VNTR analysis (18). These two serovars are particularly difficult to discriminate when using other typing methods, such as PFGE (34), VNTR (35), and MLST (36). This MST capacity is particularly interesting for the epidemiologic surveillance of the *L. interrogans* species carried in rodents, such as *Rattus norvegicus*, since they are considered the main environmental spreader of zoonotic *Leptospira* species. Indeed, rodents play an important role for the circulation of the Icterohaemorrhagiae serogroup, with high *Leptospira* sp. loads in their renal tubules (4, 27, 37, 38). Identification of the *Leptospira* sp. genotypes in the rodent population is important for assessing the risk for human or domestic animal exposure (37, 39), as well as for a better evaluation of their role in the transmission of leptospirosis in humans. With regard to *L. interrogans* serogroup Grippotyphosa, the discrimination of MST was similar to that of the VNTR method. Identification can be achieved by either one or the other method.

For *L. interrogans* serogroup Canicola, the same numbers of profiles were obtained by both the MST and VNTR methods. The MST profile was the same for *L. interrogans* serovars Jonsis and Schueffneri of the Canicola serogroup, but the VNTR profiles were different. In addition, the VNTR profiles of the Canicola and Portlandvere serovars were identical, but their MST profiles were not. A joint application of the MST and VNTR methods enables a total identification of the serovars of the Canicola serogroup. In veterinary applications, Canicola serogroup surveillance is important for the protection of dogs. These animals are vaccinated against the strains of the Canicola and Icterohaemorrhagiae serogroups (40). The regular serovar identification of these serogroups is important to define more precisely the prevalence of infecting serovars and its use for the development of the vaccines (41).

For *L. interrogans* serogroup Australis, the VNTR discrimination was superior to that of MST. However, *L. interrogans* serovars Bratislava and Australis are differentiated by only one copy for one of the VNTR loci. This could lead to ambiguous results in size determination by gel electrophoresis (19). The prevalence of the Australis serogroup increased in several countries (42, 43), and this epidemiologic surveillance allowed the evolution of a future vaccine for dogs to be defined with the addition of an Australis serovar.

With respect to the studied reference strain, the MST discriminatory power (0.98) was superior to that of VNTR (0.94). This difference is explained by the fact that MST permitted the identification of strains belonging to the same serovar as the strain belonging to *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, which leads to a better discrimination than VNTR (0.94 compared to 0.68).

Because nucleotide sequences were found identical between, for example, the Verdun strain, which was isolated in 1918 during the first World War, and recent clinical isolates of *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, we can hypothesize that the MST sequence profiles remained identical and stable in a long period of time.

MST is a simple method based on PCR and sequencing. Therefore, because it is based on the nucleotide sequence, MST provides a robust and nonambiguous result. It requires an additional sequencing step; however, the sequencing has become a routine method of DNA analysis as the cost of sequencing has decreased. The MST allowed obtaining exportable data, which represents a great resource for other laboratories in the world

through the use of nucleotide sequences deposited in GenBank. In comparison, VNTR is a rapid method based on PCR and electrophoretic migration. Thus, the VNTR analysis depends on the electrophoresis gel components and resolution limits and the locus tandem-repeat number (19, 44). These factors may affect the VNTR interpretation, which can occasionally be ambiguous at nearby high tandem-repeat numbers. This ambiguity of the serovar identification is problematic for epidemiologic applications if the research level is at the serovar or even the strain level.

For field and clinical isolates, MST and VNTR permitted the serovar identification for all isolates. The MST-PCR sensitivity was similar to that of VNTR. Moreover, the results were consistent using both the MST and VNTR methods. MST was used on isolates belonging to *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae to test the strain identification ability. From one up to five samples were tested in geographically distinct trapping sites. Thus, MST permits the precise identification of the *Leptospira* sp. strains present in the rodent populations in each area. A study on a larger rodent population will be undertaken to validate the notion of geotyping (36). The MST method may become a new genotyping method for the epidemiological surveillance of *L. interrogans* and the geographical study of the strain's repartition of the Icterohaemorrhagiae serogroup.

In conclusion, the development of MST for the *L. interrogans* species offered a new genotyping method with a high discriminatory power. MST represents an evolved genotyping method for the identification of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae because the Icterohaemorrhagiae and Copenhageni serovars were clearly identified and because this method also permitted identification at the strain level. This capacity is interesting for epidemiological applications. The MST method enabled serovar identification similar to that by the VNTR method for the other serogroup, suggesting an enlargement of the MST method for supplementary serogroups and other species, such as the other pathogenic species *L. kirschneri* and *L. borgpetersenii*.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical expertise of Diane Gandin, the team of the National Reference Center and WHO Collaborating Center for Leptospirosis (Institut Pasteur) for their help in strain identification, and the European Commission under the Food, Agriculture and Fisheries and Biotechnology theme of the 7th Framework Program for Research and Technological Development, grant agreement no. 222633, WildTech project WP6 Epidemiology and Risk assessment, which had supported the work of M.A. and F.A. This study was supported by the Laboratoire des Leptospores, VetAgroSup, Campus de Lyon, France.

A.-L.Z. performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. Z.D. conceived the study, performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. A.K. and P.D. provided the isolates and obtained the funding. A.K. analyzed the data. M.P. provided the isolates used in this study, supplied several DNA samples, and analyzed the results. M.A. coordinated this study and wrote the manuscript. F.A. provided the rodent clinical specimens. All authors read and approved the final manuscript.

## REFERENCES

1. Cerqueira GM, Picardeau M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. Infect. Genet. Evol. 9:760–768. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>.
2. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing

- world. Clin. Microbiol. Infect. 17:494–501. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>.
3. Levett PN. 2004. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? Clin. Appl. Immunol. Rev. 4:435–448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cair.2004.08.001>.
  4. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect. Dis. 3:757–771. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2).
  5. Reis RB, Ribeiro GS, Felzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, Melendez AX, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG, Ko AI. 2008. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. PLoS Negl. Trop. Dis. 2:e228. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000228>.
  6. Levett PN. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14:296–326. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>.
  7. Adler B, de la Pena Moctezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. Vet. Microbiol. 140:287–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>.
  8. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2011. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. J. Vet. Intern. Med. 25:1–13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x>.
  9. Perolat P, Chappell RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billingham ML, Letocart M, Merien F, Serrano MS. 1998. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. Int. J. Syst. Bacteriol. 48(Part 3):851–858.
  10. Saito M, Villanueva SY, Kawamura Y, Iida KI, Tomida J, Kanemaru T, Kohno E, Miyahara S, Umeda A, Amako K, Gloriani NG, Yoshida SI. 2012. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from an environmental water in Fukuoka, Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63(Part 7):2457–2462. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.047233-0>.
  11. Arent ZJ, Andrews S, Adamama-Moraitou K, Gilmore C, Pardali D, Ellis WA. 2012. Emergence of novel *Leptospira* serovars: a need for adjusting vaccination policies for dogs? Epidemiol. Infect. 141:1–6. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268812002087>.
  12. Renaud C, Andrews S, Djelouadi Z, Lecheval S, Corrao-Revol N, Buff S, Demont P, Kodjo A. 2012. Prevalence of the *Leptospira* serovars bratislava, grippotyphosa, mozdok, and pomona in French dogs. Vet. J. 196(1):126–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.10.002>.
  13. WHO. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
  14. Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. 1992. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. J. Clin. Microbiol. 30:1696–1702.
  15. Galloway RL, Levett PN. 2008. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78:628–632.
  16. Galloway RL, Levett PN. 2010. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. PLoS Negl. Trop. Dis. 4:e824. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000824>.
  17. Turk N, Milas Z, Mojcevic V, Ruzic-Sabljic E, Staresina V, Stritof Z, Habus J, Postic D. 2009. Molecular analysis of *Leptospira* spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism, real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett. 300:174–179. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01776.x>.
  18. Salaun L, Merien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. 2006. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 44:3954–3962. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00336-06>.
  19. Slack AT, Dohnt MF, Symonds ML, Smythe LD. 2005. Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 4:10. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-4-10>.
  20. Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M. 2005. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. J. Clin. Microbiol. 43:539–545. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.2.539-545.2005>.
  21. Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 5:28. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>.
  22. Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sechi LA, Hartskeerl RA, Ahmed N. 2010. Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. PLoS One 5:e12637. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012637>.
  23. Romero EC, Blanco RM, Galloway RL. 2011. Analysis of multilocus sequence typing for identification of *Leptospira* isolates in Brazil. J. Clin. Microbiol. 49:3940–3942. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01119-11>.
  24. Fournier PE, Zhu Y, Ogata H, Raoult D. 2004. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. J. Clin. Microbiol. 42:5757–5766. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.12.5757-5766.2004>.
  25. Foucault C, La Scola B, Lindroos H, Andersson SG, Raoult D. 2005. Multispacer typing technique for sequence-based typing of *Bartonella quintana*. J. Clin. Microbiol. 43:41–48. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.1.41-48.2005>.
  26. Djelouadi Z, Arnold C, Gharbia S, Raoult D, Drancourt M. 2008. Multispacer sequence typing for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. PLoS One 3:e2433. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002433>.
  27. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Man-sotte F, Brasme L, De Champs C, Bolut P, Mondot P, Faliu J, Rochereau S, Kodjo A, Andre-Fontaine G. 2009. *Leptospira* exposure in the human environment in France: a survey in feral rodents and in fresh water. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 32:463–476. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2008.05.004>.
  28. Moinet M, Fournier-Chambrillon C, Andre-Fontaine G, Aulagnier S, Mesplede A, Blanchard B, Descarsin V, Dumas P, Dumas Y, Coic C, Couzi L, Fournier P. 2010. Leptospirosis in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (*Mustelidae*, *Viverridae*) from southwestern France. J. Wildl. Dis. 46:1141–1151. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-46.4.1141>.
  29. Roqueplo C, Cabre O, Davoust B, Kodjo A. 2013. Epidemiological study of animal leptospirosis in New Caledonia. Vet. Med. Int. 2013:826834. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/826834>.
  30. Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Med. Mal. Infect. 43:1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>.
  31. Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26:2465–2466.
  32. Li W, Chomel BB, Maruyama S, Guptil L, Sander A, Raoult D, Fournier PE. 2006. Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. J. Clin. Microbiol. 44:2499–2506. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00498-06>.
  33. Drancourt M, Roux V, Dang LV, Tran-Hung L, Castex D, Chenal-Francisque V, Ogata H, Fournier PE, Crubezy E, Raoult D. 2004. Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. Emerg. Infect. Dis. 10:1585–1592. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1009.030933>.
  34. Collares-Pereira M, Korver H, Cao Thi BV, Santos-Reis M, Bellenger E, Baranton G, Terpstra WJ. 2000. Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. FEMS Microbiol. Lett. 185:181–187. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09059.x>.
  35. Pavan ME, Cairo F, Pettinari MJ, Samartino L, Brihuega B. 2011. Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 34:135–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2010.06.002>.
  36. Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Bremont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. 2013. Serovar diversity of pathogenic leptospira circulating in the French West Indies. PLoS Negl. Trop. Dis. 7:e2114. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002114>.
  37. Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C, Goarant C. 2011. Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia. PLoS Negl. Trop. Dis. 5:e1361. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001361>.
  38. Krojgaard LH, Villumsen S, Markussen MD, Jensen JS, Leirs H, Heiberg AC. 2009. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). Epidemiol. Infect. 137:1586–1592. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268809002647>.
  39. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpaboon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NP, Peacock SJ. 2007. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. PLoS Negl. Trop. Dis. 1:e56. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000056>.



40. Andre-Fontaine G. 2013. Diagnosis algorithm for leptospirosis in dogs: disease and vaccination effects on the serological results. *Vet. Rec.* 172(19):502. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.101333>.
41. Ellis WA. 2010. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet. Rec.* 167:602–605. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.c4965>.
42. Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nockler K, Kohn B. 2013. Distribution of leptospira serogroups in dogs from berlin, Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13:200–202. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2012.1121>.
43. Koizumi N, Muto MM, Akachi S, Okano S, Yamamoto S, Horikawa K, Harada S, Funatsumaru S, Ohnishi M. 2012. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 62:630–636. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.050039-0>.
44. Pavan ME, Brihuega B, Pettinari MJ, Cairo F. 2011. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of reference strains used for the diagnosis of leptospirosis in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 43:251–255. <http://dx.doi.org/10.1590/S0325-75412011000400003>.

## Annexe 8

**Table 17 – Coordonnées géographiques des sites de capture  
des rats surmulots dans le Rhône (2011 – 2012)**

site	WGS84
2 vallées-1	45°51'01.82"N 4°30'02.77"E
Berthellier père	45°51'18.57"N 4°30'57.86"E
berthier	45°51'42.03"N 4°30'54.95"E
Bony Alain	45°33'06.89"N 4°42'50.46"E
Da Rocha	45°33'37.26"N 4°46'17"E
Faisan Maxime 1	45°33'31.55"N 4°46'28.38"E
francheville oiseaux	45°44'28.87"N 4°44'04.06"E
guillotière	45°45'8.99"N 4°50'51.29"E
J.Jaurès - Oullins	45°42'41.16"N 4°49'12.77"E
jacquet	45°33'47.29"N 4°44'48.51"E
la chapelle - Lyon 9	45°45'52.58"N 4°47'24.28"E
laurent (notaire)-2	45°51'41.61"N 4°30'15.61"E
Mercier-Tassin	45°46'17.90"N 4°43'21.11"E
Mermoz sud_B	45°43'43.05"N 4°53'09.75"E
Mermoz sud_F	45°43'38.35"N 4°53'5.31"E
Mermoz sud_R	45°43'45.05"N 4°52'57.35"E
Mille	45°51'13.82"N 4°32'49.97"E
Oberlin	45°52'19.29"N 4°31'59.75"E
Pigeons	45°33'37.48"N 4°44'50.04"E
poubelle	45°34'30.72"N 4°45'42.35"E
Poulailler pradel	45°49'24.38"N 4°35'21.55"E
PTO_déchett.	45°46'26.95"N 4°51'30.20"E
UIOM	45°43'27.36"N 4°50'16.90"E

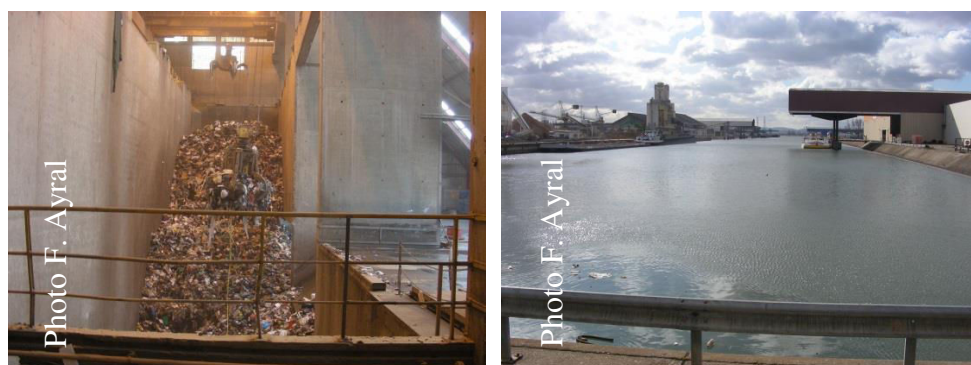
## Annexe 9

**Table 18 – Caractéristiques des fermes où les rats ruraux ont été capturés**  
**densité de rats a été estimée sur une échelle de 0 à 3 selon les traces de présence (e.g. terriers, allée de passage, crottes, observations de rats)**

Coordonnées nord	Coordonnées est	densité de rats	Type de production	Système d'exploitation	nombre de bâtiments	Surface terrains (en ha)	vaches	porcs	volailles	moutons	chèvres
45°33'37.26"N	4°46'17.28"E	3	mixte	extensif	5	30	0	0	100	0	0
45°33'37.48"N	4°44'50.04"E	2	animal	extensif	1	0,01	0	0	60	0	0
45°33'47.29"N	4°44'48.51"E	3	mixte	extensif	2	0,8	0	0	7	0	0
45°33'06.89"N	4°42'50.46"E	3	mixte	extensif	8	1,6	0	0	35	0	0
45°33'31.55"N	4°46'28.38"E	4	animal	extensif	5	6,1	0	0	4000	0	0
45°51'42.03"N	4°30'54.95"E	3	mixte	extensif	6	10	20	1	20	0	0
45°51'01.82"N	4°30'02.77"E	2,5	animal	extensif	5	70	15	0	100	50	25
45°51'01.82"N	4°30'02.77"E	1,5	animal	extensif	5	70	15	0	100	50	25
45°51'41.11"N	4°30'16.47"E	1,5	animal	extensif	4	15	0	0	6	0	0
45°52'18.96"N	4°32'0.67"E	3,5	animal	extensif	1	4	0	0	17	0	0
45°49'24.38"N	4°35'21.55"E	3,5	animal	intensif	3	3	0	0	2000	0	0
45°51'13.82"N	4°32'49.97"E	2	mixte	extensif	2	5	15	0	4	0	0
45°51'18.57"N	4°30'57.86"E	1,5	mixte	extensif	7	4	4	0	10	0	0



**Site de mermoz constitué de 15 immeubles dont les habitations sont à loyer modéré (HLM), les immeubles B (20 pièges), F (12 pièges et 4 tapettes) et R (24 tapettes) ont fait l'objet de capture de rat.**



**Site de l'usine d'incinération d'ordures ménagères de l'agglomération de Lyon (25 pièges) (gauche) et son environnement, port attenant au Rhône (droite)**



**Parc de la Tête d'or - île des lémuriens (25 pièges) dans et autour de ce site**

**Figure 21 - Sites de capture des rats surmulots à Lyon**

## Annexe 11



**Piège à simple entrée de 28 cm x 9 cm x 9 cm (gauche)  
et piège à simple entrée de 50 cm x 15 cm x 15 cm**



**Piège à simple entrée de 50 cm x 15 cm x 15 cm  
contenant un rat surmulot**

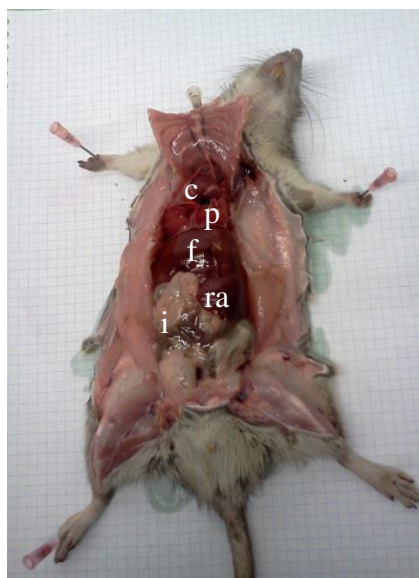
**Figure 12 – Outils de capture des rats**



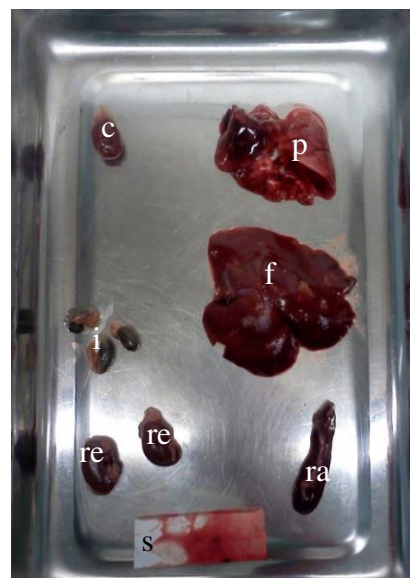
**Relevé des variables morphométriques du rat sous anesthésie**



**Dispositif pour la dissection des rats après leur euthanasie, hotte à flux laminaire Spéciale Animalerie CRLF/ faster stab 4**



**Rat après incision abdominale et ouverture de la cage thoracique. Dégagement du cœur (c), du poumon (p), du foie (f), de la rate (r), des intestins (i).**



**Organes collectés avant échantillonnage et analyses de laboratoire, cœur (c), poumon (p), foie (f), intestins contenant des fécès (i), reins (re), sang sur buvard (s)**

**Figure 22 - Étapes de traitement des rats surmulots capturés**

## Annexe 13

**Table 19 – Distribution of four potential zoonotic agents**  
*L. interrogans*, SEOV, HEV and *T. gondii* positive and negative-test results  
among 120 rats simultaneously screened on the 3 pathogens.

	<i>L. interrogans</i>				SEOV			HEV			SEOV and/or HEV		
		Neg	Pos (95% CI)	p value <sup>a</sup>	Neg	Pos (95% CI)	p value <sup>a</sup>	Neg	Pos (95% CI)	p value <sup>a</sup>	Neg	Pos (95% CI)	p value <sup>a</sup>
<i>L. interrogans</i>	Neg	85	-		78	7		77	8		70	15	
	Pos	-	35	-	24	11	0,003	24	11	0,006	16	19	0,0001
SEOV	Neg				102	-		86	16				
	Pos				-	18	-	15	3	na			
HEV	Neg							101	-				
	Pos							-	19	-			

<sup>a</sup>Determined using the chi-squared test (n≥5).


At p value ≤0.05 non-identical test-positive and test-negative populations is concluded.



## Annexe 14

**Table 20 – Distribution of rat covariates  
among *L. interrogans*, SEOV, HEV and *T. gondii* infected status in Norway rats.**

category	subcategory	Total (%) <sup>b</sup> (n=178)	<i>L. interrogans</i> status			SEOV status			HEV status			<i>T. gondii</i> status		
			Positive (%) <sup>c</sup> (n=45)	Negative (%) <sup>c</sup> (n=126)	p value <sup>a</sup>	Positive (%) <sup>c</sup> (n=18)	Negative (%) <sup>c</sup> (n=109)	p value <sup>a</sup>	Positive (%) <sup>c</sup> (n=20)	Negative (%) <sup>c</sup> (n=122)	p value <sup>a</sup>	Positive (%) <sup>c</sup> (n=6)	Negative (%) <sup>c</sup> (n=71)	p value <sup>a</sup>
Survival during capture	Alive (%)	78 (44%)	25 (15%)	48 (28%)		11 (9%)	45 (35%)		8 (6%)	43 (30%)		2 (3%)	39 (51%)	
	Dead (%)	100 (56%)	20 (12%)	78 (46%)	0.063	7 (5%)	64 (50%)	0.189	12 (8%)	79 (56%)	0.873	4 (5%)	32 (41%)	na
Rat preservative	Fresh (%)	108 (61%)	35 (24%)	68 (46%)		14 (11%)	70 (57%)		13 (10%)	72 (58%)		4 (5%)	60 (78%)	
	Frozen (%)	47 (26%)	6 (4%)	39 (26%)	0.017	4 (3%)	34 (28%)	na	5 (4%)	34 (27%)	0.929	2 (3%)	11 (14%)	na
Maturity	Adult (%)	112 (63%)	40 (23%)	66 (39%)		17 (13%)	70 (55%)		17 (12%)	69 (48%)		6 (8%)	45 (58%)	
	Juvenil (%)	66 (37%)	5 (3%)	60 (35%)	<0.001	1 (1%)	39 (31%)	0.022	3 (2%)	53 (37%)	na	0 (0%)	26 (34%)	na
Sex	Female (%)	80 (45%)	16 (9%)	61 (36%)		6 (4%)	46 (37%)		8 (6%)	53 (38%)		2 (2%)	22 (28%)	
	Male (%)	96 (54%)	29 (17%)	63 (37%)	0.162	12 (10%)	61 (48%)	0.61	11 (8%)	68 (48%)	0.912	4 (5%)	49 (64%)	na
Adult female pregnant	No (%)	39 (22%)	10 (18%)	27 (50%)		5 (12%)	23 (56%)		4 (9%)	25 (60%)		2 (10%)	12 (60%)	
	Yes (%)	18 (10%)	6 (11%)	11 (20%)	0.766	1 (2%)	12 (29%)	na	2 (5%)	11 (26%)	na	0 (0%)	6 (30%)	na
Weight (g)	Median	218	250	169		258.5	218		218	201.5		340.6	203	
	(IQR)	(91.0 - 293.5)	(203 - 312)	(79.4 - 276.5)	<0.001	(188.6 - 311.5)	(90 - 292)	0.173	(123.2 - 252.2)	(88 - 300.2)	0.993	(317.8 - 404.1)	(75 - 287.5)	0.004
Size (cm)	Median	21	22.5	19.6		23.2	21		21.5	20.35		23.25	21	
	(IQR)	(16.5 - 23.5)	(21 - 24)	(15.5 - 22.5)	<0.001	(20.5 - 24.7)	(16.6 - 23.0)	0.047	(17.4 - 22.6)	(16.1 - 23)	0.583	(22.7 - 23.5)	(15.5 - 23.5)	0.08
Body condition	Median	-7.6	-1.8	-5.9		-11.8	-10.5		-11.7	-7.2		18.2	-7.0	
	(IQR)	(-36.1 ; -37.7)	(-33; 30)	(-29 ;28)	0.115	(-24; 31)	(-31; 28)	0.435	(-32; 36)	(-30; 27)	0.365	(-34; 43)	(-31; 32)	0.005

<sup>a</sup>Determined using the chi-squared test for discrete variables (n≥5) or Wilcoxon test for continuous variables. At p value ≤0.05, non-identical rat-positive and rat-negative populations is concluded. 

<sup>b</sup>Percentage is calculated considering the total of 178 rats sampled.

<sup>c</sup>Percentage are calculated within the contingency table (category x pathogen status)



## Annexe 15

**Table 21 – Distribution of socio-economic variables  
among *L. interrogans*, SEOV, HEV and *T. gondii* infected status in Norway rats.**

	<i>L. interrogans</i> status			SEOV status			HEV status			<i>T. gondii</i> status		
	Positive	Negative	p value	Positive	Negative	p value	Positive	Negative	p value	Positive	Negative	p value
Population (med	16094.37	82.98	<0.001	16094.37	82.98	<0.001	16094.37	82.98	0.009	10168.07	16094.37	0.497
SD	9124.66	6460.24		8754.26	8867.60		7339.86	8927.43		12073.71	9280.15	
Pop expens (mec	0.97	1.12	0.02	0.97	1.03	0.685	0.97	1.04	0.283	1.04	0.97	0.041
SD	0.24	0.43		0.12	0.47		0.13	0.45		0.44	0.47	
Incomes (mediar	9226	20159	<0.001	9226	20576	<0.001	9226	20159	<0.001	17968	16715	0.459
SD	5795.40	4671.91		5827.13	6078.42		4961.74	5411.64		6198.36	7293.96	
Pop 20-64 (medi	0.56	0.58	0.011	0.56	0.58	0.014	0.56	0.58	0.005	0.59	0.56	0.447
SD	0.09	0.16		0.02	0.17		0.01	0.17		0.17	0.20	
perc flat (mediar	0.96	0.13	<0.001	0.96	0.96	0.411	0.96	0.53	0.99	0.98	0.96	0.943
SD	0.33	0.40		0.33	0.43		0.39	0.42		0.35	0.26	
perc small flat (n	0.25	0.06	<0.001	0.25	0.20	0.012	0.25	0.12	0.051	0.26	0.25	0.335
SD	0.09	0.09		0.09	0.10		0.09	0.10		0.10	0.07	
Ratio renters (m	0.03	2.27	<0.001	0.03	0.18	0.343	0.03	0.59	0.253	0.18	0.03	0.083
SD	1.86	3.01		2.63	3.23		1.58	2.82		4.22	3.16	
Ratio LID (media	0.94	0.15	<0.001	0.94	0.15	<0.001	0.94	0.15	<0.001	0.52	0.52	0.783
SD	0.34	0.28		0.27	0.36		0.36	0.35		0.31	0.43	
Ratio graduation	0.39	0.12	<0.001	0.39	0.12	<0.001	0.39	0.12	<0.001	0.13	0.13	0.738
SD	0.14	0.10		0.13	0.14		0.13	0.13		0.12	0.18	
Family size (med	0.35	0.09	<0.001	0.36	0.09	<0.001	0.36	0.09	<0.001	0.20	0.23	0.55
SD	0.12	0.10		0.09	0.13		0.12	0.12		0.12	0.16	
Unemployment (	0.37	0.06	<0.001	0.37	0.06	<0.001	0.37	0.06	<0.001	0.17	0.19	0.648
SD	0.14	0.10		0.12	0.14		0.14	0.13		0.11	0.17	

aDetermined using the Wilcoxon test. At p value  $\leq 0.05$ , non-identical rat-positive and rat-negative populations is concluded. <sup>a</sup>

## Annexe 16

**Table 22 – Distribution of variables ‘human population’ and ‘median incomes’ (median and standard error - SD - ) extracted from the four (a; b; c and d) quadrats and comparison between infected or exposed and non-infected or -exposed rats, tested with bivariate logistic regression.**

	L. interrogans status (n=171)			SEOV status (n=127)			HEV status (n=142)		
	Negative	Positive	p value	Negative	Positive	p value	Negative	Positive	p value
Population a (median)	83.0	12038.8	< 0.001	83.0	12038.8	< 0.001	83.0	12775.4	0.002
SD	5149.8	6948.9		7060.1	6261.7		6765.3	6442.8	
Population b (median)	83.0	10008.2	< 0.001	83.0	10008.2	0.003	83.0	10008.2	0.009
SD	4912.3	7406.5		6874.2	6877.6		7079.2	4550.8	
Population c (median)	204.3	10595.4	< 0.001	204.3	10595.4	0.003	204.3	10595.4	0.01
SD	3677.9	5735.2		5377.4	4850.7		5084.4	5081.0	
Population d (median)	342.2	9142.7	< 0.001	1076.3	9142.7	< 0.001	1076.3	9142.7	0.06
SD	4704.0	7282.3		6585.1	6735.9		6835.2	4152.6	
Incomes a (median)	20002.5	14775.4	< 0.001	20576.0	14775.4	< 0.001	19846.0	11004.1	< 0.001
SD	3425.9	4178.9		4700.7	2599.9		3824.2	4395.9	
Incomes b (median)	19569.2	17554.3	< 0.001	20367.5	17554.3	0.001	19492.0	17554.3	0.008
SD	2318.0	2075.9		2596.2	537.5		2595.5	1174.5	
Incomes c (median)	20161.2	18769.8	< 0.001	20576.0	18769.8	< 0.001	20161.2	18769.8	0.001
SD	2311.6	1879.7		2128.4	899.8		2281.1	650.9	
Incomes d (median)	20159.5	18615.8	< 0.001	20576.0	18615.8	< 0.001	19599.1	18615.8	0.02
SD	2187.2	1529.7		7092.7	6443.2		2098.0	718.2	

<sup>a</sup>Determined using the Wilcoxon test. At p value  $\leq 0.05$ , non-identical rat-positive and rat-negative populations is concluded.

# Annexe 17

**Table 23 – Capture success and infected rats in 5 trapping sites  
and results from the Pearson correlation tests to investigate the between capture success and infected rats.**

Site	no trapping day	rat trapp	capture success	L. interrogans			T. gondii			SEOV			HEV		
				no of infected rats	proportion of infected rats	Pearson coefficient (p-value)	no of infected rats	proportion of infected rats	Pearson coefficient (p-value)	no of infected rats	proportion of infected rats	Pearson coefficient (p-value)	no of infected rats	proportion of infected rats	Pearson coefficient (p-value)
UIOM	360	23	0,064	2	0,0869	0,15	1	0,0434	-0,127	0	0	-0,0939	0	0	0,757
PTO	80	8	0,1	5	0,625	(0,804)	2	0,25	(0,8377)	2	0,25	(0,8806)	0	0	(0,1380)
M-R	42	7	0,167	3	0,4286		0	0		0	0		5	0,7142	
M-F	161	17	0,105	12	0,7059		1	0,0588		9	0,52941		3	0,1765	
M-B	169	13	0,076	9	0,6923		0	0		2	0,1538		5	0,385	

# Annexe 18

**Table 24 – Coefficients**

**related to a significant (s) or not significant (ns) p-value in the simple logistic regrassion models (SLR), multiple logistic regrassion selected by the stepwise (stw) function and mixed model using sites as a random variable.**

**\* indicated models in which «capture success» was incorporated.**

Variable	L. interrogans					HEV					SEOV					T. gondii				
	SLR	MLR (stw)	MLR (stw*)	GLMM	GLMM*	SLR	MLR (stw)	MLR (stw*)	GLMM	GLMM*	SLR	MLR (stw)	MLR (stw*)	GLMM	GLMM*	SLR	MLR (stw)	MLR (stw*)	GLMM	GLMM*
Preservation	ns					ns					ns					ns				
Survival	ns					ns					ns					ns				
Maturity	s	s	s	s	s	ns	ns	ns	ns	ns	s					ns	ns	ns	ns	ns
Sex	ns					ns					ns					ns				
Weight	s					ns					ns					s				
Size	s					ns					ns					ns				
Capture success	ns		ns		ns	s		ns		ns	ns		ns		ns	ns		ns		ns
Population density	s					ns					s	ns	ns	ns	ns	ns				
Incomes	s	ns	s	ns	s	ns					s	ns	ns	ns	ns	ns				
Pop expens	s					s					s					ns				
Perc foreign	s					ns	ns	ns	ns	ns	s					ns	ns	ns	ns	ns
Pop 20-64 years old	s					ns					ns					ns				
Dweling density	s					ns					s					ns				
Perc flat	s					ns					s					ns				
Perc small flat	s					ns					s					ns				
Ratio renters	ns					ns					ns					s				
Ratio Low Inc. Dwel	s					ns					s					ns				
Ratio education	s					ns					s					ns				
Ratio family size	s					ns					s					ns				
Ratio unemployment	s					ns					s					ns				

## Annexe 19

### Modèle de dynamique des populations de *Rattus norvegicus* Programmé par Dominique J Bicout

#### Aspect démographique:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dJ}{dt} = F(t) - s_1 F(t - T_1) - \mu_1 J \\ \frac{dA}{dt} = s_1 F(t - T_1) - \mu_2 \left(1 + \frac{A}{A_{max}}\right) A \end{array} \right. \quad (1)$$

$\frac{dJ}{dt}$ : variation de la population de juvéniles au cours du temps.

$\frac{dA}{dt}$ : variation de la population d'adulte au cours du temps.

$F(t)$ : variation de la fécondité au cours du temps.

$\mu_1 J$ : mortalité des rats juvéniles,

$\mu_2 A$ : mortalité des rats adultes,

$T_1$ : durée (jour) du stade juvénile,

$A_{max}$ : nombre de rats au-delà duquel la mortalité augmente,

$s_1 = e^{-\mu_1 T_1}$ : probabilité de survie des juvéniles.

$F(t)$  est le nombre de juvéniles nouveau-nés par unité de temps tel que,

$$F(t) = \mu_2 \sum_{m=1}^{\infty} f_m r_m(t|t - mT_2) A(t - mT_2) \quad (2)$$

$T_2$ : délai (jour) entre 2 mises bas,

$m$ : parité d'une ratte,

$f_m$ : fécondité maximale

$r_m(t|t - mT_2)$ : probabilité de survie des adultes, entre le temps  $t - mT_2$  et le temps  $t$ .  $r_m$  est calculé comme suit,

$$\left\{ \begin{array}{l} r_m(t|t - mT_2) = \prod_{n=1}^m s(t - (n-1)T_2|t - nT_2) \\ s(t|t_0) = \frac{e^{-\mu_1(t-t_0)}}{1 + \left(\frac{A(t_0)}{A_{max}}\right)[1 - e^{-\mu_1(t-t_0)}]} \end{array} \right. \quad (3)$$

La fonction fécondité suit un cycle de variation bisannuelle avec deux pics de fécondité au printemps et à l'automne.

#### Taux de reproduction de base:

$Q_0$  est défini comme le nombre de juvéniles nés d'une même ratte.

$$Q_0 = f * s_1 \sum_{m=1}^{\infty} s_2^m = \frac{f * s_1 * s_2}{1 - s_2} \quad (4)$$

$s_2 = e^{-\mu_2 T_2}$ , la probabilité de survie des adultes.

La phase stationnaire:

$A_s$  et  $J_s$  sont respectivement les effectifs de juvénils et d'adultes lorsque la population atteint son équilibre.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{J_s}{A_s} = \left( \frac{\mu_2}{\mu_1} \right) \left( \frac{1-s_1}{s_1} \right) \sqrt{Q_0} \\ A_s = K = (\sqrt{Q_0} - 1) A_{max} \end{array} \right. \quad (5)$$

Détermination des milieux urbain et rural type

Populations type:

**Table 25 – Paramètres définissant les populations urbaines et rurales**

	Paramètres											
	dt (année)	T1 (j)	s <sub>J</sub>	Alft (j)	T2 (j)	Nlay	fmin	fmax	Tper (j)	Amax	K	Q0
Pop. urbaine	10	90	1	730	60	61	8	12	365	50	382,2	75
Pop. Rurale	10	90	1	730	60	61	4	16	365	200	1022	37

**Table 26 – Liste des souches de *Leptospira* spp  
utilisées pour le test de microagglutination chez les chiens <sup>(c)</sup> et chez les bovins <sup>(b)</sup> au laboratoire  
des Leptospires-Lyon.**

Nom du séro groupe (abréviation)	Nom du sérovar	Souche	Origine
ICTEROHAEMORRHAGIAE (IH) <sup>b,c</sup>	icterohaemorrhagiae	19	ENVN
	icterohaemorrhagiae	RGA	CNR
	copenhageni	Wijnberg	CNR
	munchen	Munchen C 90	CNR
AUSTRALIS (AUS) <sup>b,c</sup>	munchen	372	ENVN
	australis	Ballico	CNR
	bratislava	Jez-Bratislava	CNR
AUTOMNALIS (AUT) <sup>b,c</sup>	automnalis	Akiyami A	CNR
	bim	1051	CNR
BALLUM (BAL) <sup>c</sup>	castellonis	Castellon 3	CNR
BATAVIAE (BAT) <sup>b,c</sup>	bataviae	Van Tienen	CNR
CANICOLA (CAN) <sup>c</sup>	canicola	Hond Hutrecht IV	CNR
GRIPPOTYPHOSA (GRIP) <sup>b,c</sup>	grippotyphosa	Moskva V	CNR
	vanderhoedoni	Kipod 179	CNR
HEBDOMADIS (HEB)	kremastos	Kremastos	CNR
	hebdomadis	Hebdomadis	CNR
PANAMA (PAN) <sup>c</sup>	manama	CZ 214 K	CNR
	mangus	TRVL/CAREC137774	CNR
POMONA (POM) <sup>c</sup>	pomona	Pomona	CNR
	mozdok	5621	CNR
PYROGENES (PYR) <sup>c</sup>	pyrogenes	Salinem	CNR
	sejroe	M84	CNR
SEJROE (SJ) <sup>b,c</sup>	saxkoebing	Mus 24	CNR
	hardjo	Hardjoprajitno	CNR
TARASSOVI (TAR)	tarassovi	Perepelitsin	CNR
CYNOPTERI (CYN)	cynopteri	-	CNR

## Annexe 21

Sorties de l'analyse spatiale par Satscan v9.3.1 à partir des cas de leptospirose canine incluant les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola

### SUMMARY OF DATA

Study period.....: 2008/1/1 to  
2012/12/31  
Number of locations.....: 95  
Total population.....: 8881897  
Total number of cases.....: 747  
Annual cases / 100000.....: 1.7

Observed / expected...: 3.75

Relative risk.....: 3.99

Log likelihood ratio...: 37.266978

P-value.....: 0.0000000000047

**3.Location IDs included.: 64, 65, 40, 32, 31, 47, 33, 9, 82, 24**

Coordinates / radius.: (56.355000 N,  
4.707358 W) / 237.30 km

Time frame.....: 2011/3/1 to 2012/12/31

Population.....: 949957

Number of cases.....: 60

Expected cases.....: 29.39

Annual cases / 100000.: 3.4

Observed / expected...: 2.04

Relative risk.....: 2.13

Log likelihood ratio...: 12.877405

P-value.....: 0.037

**4.Location IDs included.: 44**

Coordinates / radius.: (60.461941 N,  
5.786107 W) / 0 km

Time frame.....: 2008/8/1 to 2010/12/31

Population.....: 160819

Number of cases.....: 23

Expected cases.....: 6.54

Annual cases / 100000.: 5.9

Observed / expected...: 3.52

Relative risk.....: 3.60

Log likelihood ratio...: 12.655908

P-value.....: 0.044

### CLUSTERS DETECTED

**1.Location IDs included.: 2, 8, 60, 51, 59, 80, 93, 77, 95, 94, 75, 92, 62**

Coordinates / radius.: (62.513611 N,  
1.671529 E) / 137.77 km

Time frame.....: 2010/6/1 to 2012/11/30

Population.....: 1776786

Number of cases.....: 165

Expected cases.....: 74.76

Annual cases / 100000.: 3.7

Observed / expected...: 2.21

Relative risk.....: 2.55

Log likelihood ratio...: 46.734628

P-value.....: 0.000000000000017

**2.Location IDs included.: 1, 69, 39, 74**

Coordinates / radius.: (58.992470 N,  
3.644109 E) / 83.21 km

Time frame.....: 2010/3/1 to 2012/8/31

Population.....: 386400

Number of cases.....: 61

Expected cases.....: 16.28

Annual cases / 100000.: 6.3



## Annexe 22

Sorties de l'analyse spatiale par Satscan v9.3.1 à partir des cas de leptospirose canine excluant les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola

### SUMMARY OF DATA

Study period.....: 2008/1/1 to  
2012/12/31  
Number of locations.....: 95  
Total population.....: 8881897  
Total number of cases.....: 566  
Annual cases / 100000.....: 1.3

---

### CLUSTERS DETECTED

#### 1.Location IDs included.: 1, 69, 39, 74

Coordinates / radius.: (58.992470 N,  
3.644109 E) / 83.21 km  
Time frame.....: 2010/3/1 to 2012/8/31  
Population.....: 386400  
Number of cases.....: 49  
Expected cases.....: 12.33  
Annual cases / 100000.: 5.1  
Observed / expected...: 3.97  
Relative risk.....: 4.26  
Log likelihood ratio..: 32.175731  
P-value.....: 0.0000000028

#### 2.Location IDs included.: 92, 75, 94

Coordinates / radius.: (61.805354 N,  
0.233386 W) / 15.24 km  
Time frame.....: 2010/8/1 to 2012/12/31  
Population.....: 257464  
Number of cases.....: 38  
Expected cases.....: 7.94  
Annual cases / 100000.: 6.1

Observed / expected...: 4.79

Relative risk.....: 5.06

Log likelihood ratio..: 30.265690

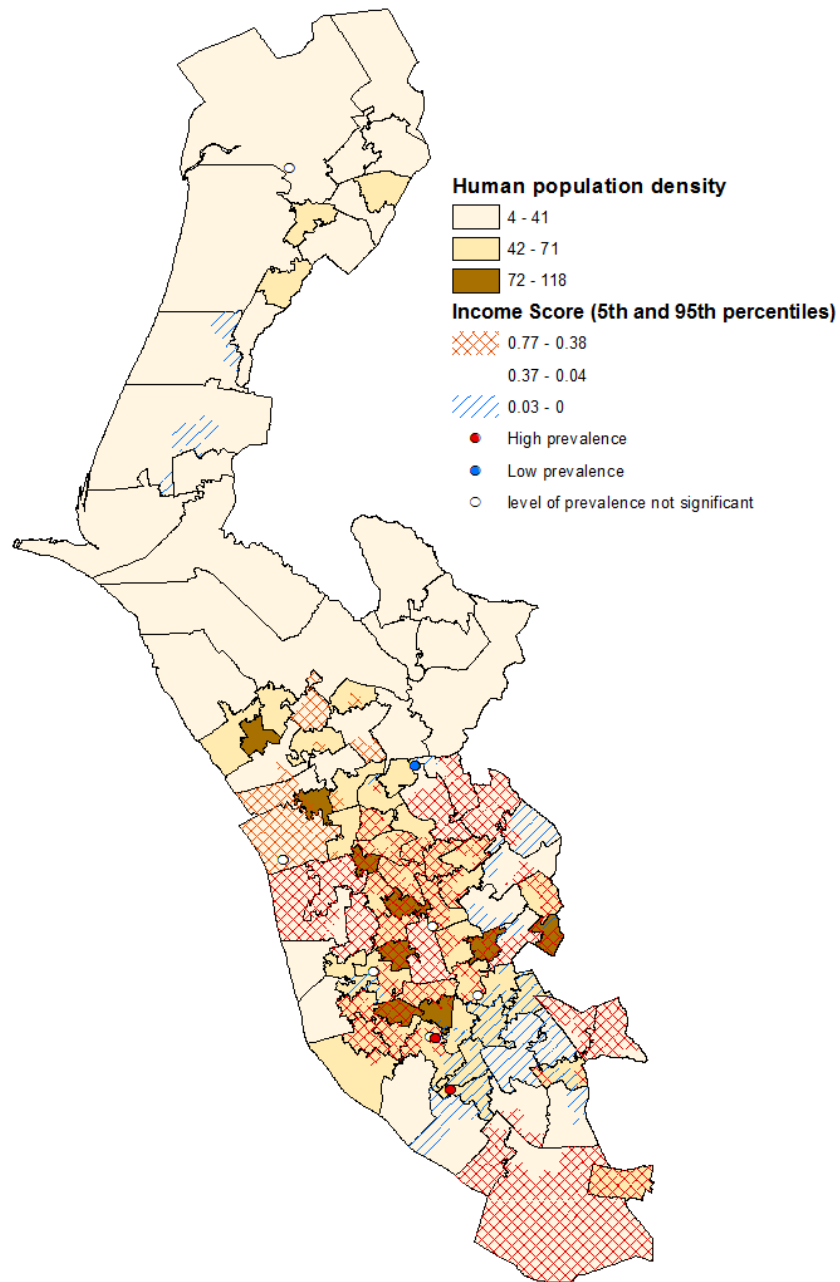
P-value.....: 0.000000014

#### 3.Location IDs included.: 20

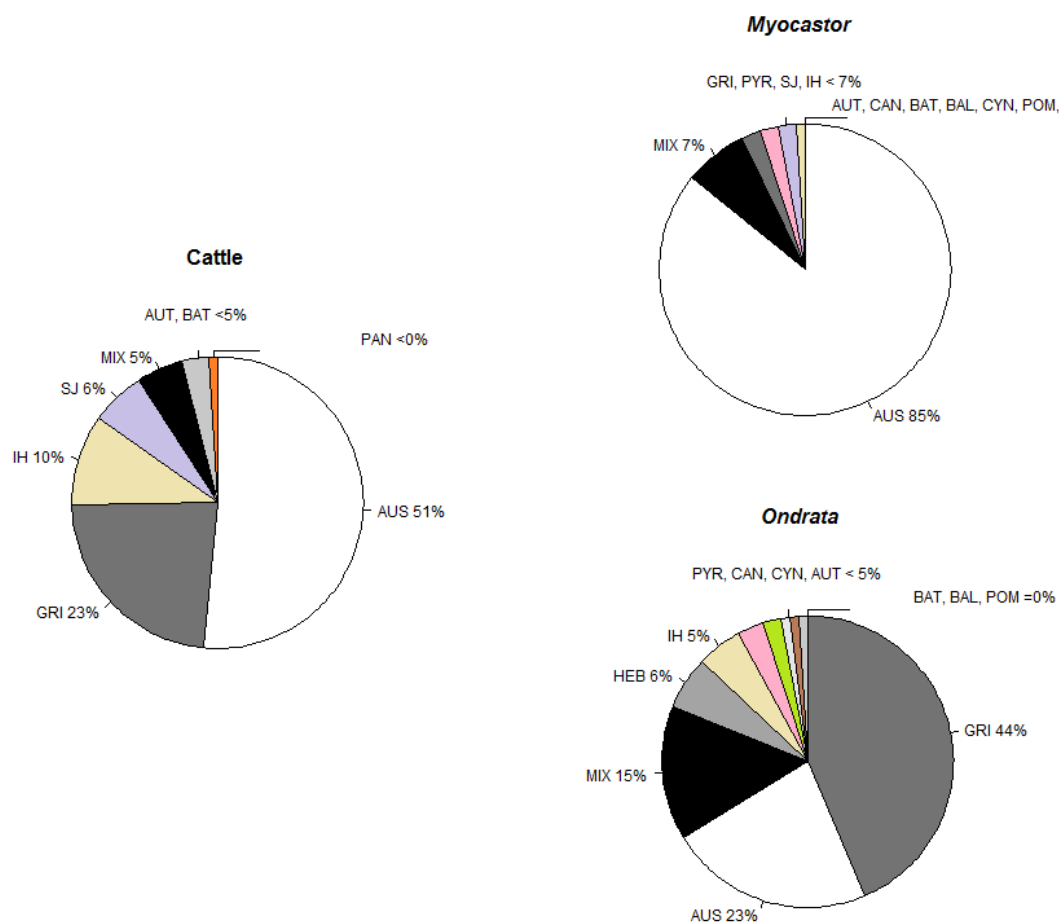
Coordinates / radius.: (54.594075 N,  
7.821225 E) / 0 km  
Time frame.....: 2009/10/1 to 2010/4/30  
Population.....: 18733  
Number of cases.....: 5  
Expected cases.....: 0.14  
Annual cases / 100000.: 46.0  
Observed / expected...: 36.10  
Relative risk.....: 36.41  
Log likelihood ratio..: 13.090324  
P-value.....: 0.027

#### 4.Location IDs included.: 64, 65, 40, 32, 31,

47, 33, 9, 82, 24  
Coordinates / radius.: (56.355000 N,  
4.707358 W) / 237.30 km  
Time frame.....: 2011/3/1 to 2012/12/31  
Population.....: 949957  
Number of cases.....: 49  
Expected cases.....: 22.27  
Annual cases / 100000.: 2.8  
Observed / expected...: 2.20  
Relative risk.....: 2.31  
Log likelihood ratio..: 12.583275  
P-value.....: 0.033



**Figure 24 – The spatial distribution of human population density and median incomes in Liverpool city centre overlaid with low and high prevalence of leptospiral carriage among 130 Norway rats**



**Figure 25 – Distribution des sérogroupes**

parmi des rongeurs aquatiques (données ANSES) et des bovins d'une même zone hydrographique résultats suggérant la prédominance d'Australis chez les bovins et les ragondins (*Myocastor*) alors que les rats musqués (*Ondrata*) sont plus fréquemment porteurs du séro groupe Grippytyphosa.

## VALORISATION DES TRAVAUX

### ARTICLES SCIENTIFIQUES

**Ayral F.**, Zilber A.-L., Bicout D. J., Kodjo A., Artois M., Djelouadji Z. Distribution of *Leptospira* strains by Multispacer Sequence Typing in urban Norway rats (*Rattus norvegicus*), a survey in France 2012-2013. Accepté par *PLoS ONE*

**Ayral F.**, Bicout D. J., Pereira H., Artois M., Kodjo A. Distribution of *Leptospira* serogroups in cattle herds and dogs in France. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Oct 91:756-9

**Ayral F.**, Artois J, Zilber AL, Widén F, Pounder KC, Aubert D, Bicout DJ, Artois M. The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010-2012). *Epidemiol Infect.* 2014 May 16:1-14

Dupinay T, Pounder KC, **Ayral F.**, Laaberki MH, Marston DA, Lacôte S, Rey C, Barbet F, Voller K, Nazaret N, Artois M, Marianneau P, Lachuer J, Fooks AR, Pépin M, Legras-Lachuer C, McElhinney LM. Detection and genetic characterization of Seoul Virus from commensal brown rats in France. *Virol J.* 2014, 11:32.

Zilber AL, Picardeau M, **Ayral F.**, Artois M, Demont P, Kodjo A, Djelouadji Z. High-Resolution Typing of *Leptospira interrogans* Strains by Multispacer Sequence Typing. *J Clin Microbiol.* 2014, 52(2):564-71.

Widén F, **Ayral F.**, Artois M, Olofson AS, Lin J. PCR detection and analyzis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats. *Virol J.* 2014; 11(1):90.

**Ayral F.** La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France, établir un programme de lutte. *Bulletin des GTV.* 2014, 73: 111-119

**Ayral F.**, Bicout D. J., Artois M., Kodjo A. Prévention de la leptospirose bovine: Distribution des sérogroupes de leptospires infectants dans les cheptels bovins à partir des résultats de MAT. *Bulletin de l'AEEMA.* 2013, n°64: 111-9

**Ayral F.** La leptospirose bovine dans les cheptels en France, impact économique de l'infection. *Bulletin des GTV.* 2013, 69: 61 – 67

**Ayral F.** Les Hantaviroses à Virus Séoul: émergence d'une zoonose chez les rats en Europe. *Point Vét.* 2013, 336: 14 – 18

## COMMUNICATIONS ORALES

Disease risk mapping for surveillance of zoonotic pathogens in Norway rats; preliminary results in France (2010 – 2012).

Présentation orale à Global Risk Forum, Davos, Suisse, 18-20 Novembre 2013

Ecology of zoonotic pathogens in *Rattus Norvegicus*, a survey in France.

Présentation orale à ECVPH Conferences, Turin, Italie, 19-20 Septembre 2013

Distribution géographique du risque leptospirosique en France.

Présentation orale au Symposium des leptospires, Marcy L'etoile, France, 5 Avril 2012.

Geographic distribution of domestic leptospira serology in domestic animals in France, 2008 – 2010 Présentation orale à ECVPH Conferences, Brno, République Tchèque, 6-7 Octobre 2011

## COMMUNICATIONS AFFICHÉES

Florence C Ayrat, Anne-Laure Zilber, Frederik Widen, Kieran Pounder, Isabelle Villena, Dominique J Bicout, Zorée Djelouadji, Lorraine McElhinney et Marc Artois.

Ecology of zoonotic pathogens in *Rattus Norvegicus*, a survey in France

ECVPH Conferences, Turin, Italie, 19-20 Septembre 2013

*Roberto Chizzolini Memorial Poster Award 2013*

Florence C. Ayrat, Dominique J. Bicout, Marc Artois et Angeli Kodjo.

Vaccination contre la leptospirose bovine en France: évaluation de l'impact vaccinal à partir de données de laboratoire.

AEEMA conférences, Maison-Alfort, France, 30-31Mai 2013

Florence C. Ayrat, Dominique J. Bicout, Marc Artois, Zorée Djelouadji, Angeli Kodjo

Spatial approach for leptospirosis risk assessment in livestock, a survey in France 2008 – 2011

ISVEE, Maastricht, Netherlands, 20-24 août 2012

Florence C. Ayrat, Marc Artois, Zorée Djelouadji, Angeli Kodjo.

Geographic distribution of domestic leptospira serology in domestic animals in France, 2008 – 2010 ECVPH Conferences, Brno, République Tchèque, 6-7 Octobre 2011